

**Aus dem Chemotherapeutischen Forschungszentrum Georg-Speyer-Haus
Frankfurt am Main**

Arbeitsgruppe Prof. Winfried Wels

**Abhängigkeit der CD95L-induzierten
Apoptose von Proliferationsverhalten
und Zelldichte bei der humanen
Kolonkarzinomzelllinie RKO**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Tim Bläsner
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main 2006

Dekan:	Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. W. Wells
Koreferent:	Prof. Dr. med. H. v. Melchner
Tag der mündlichen Prüfung:	21.8.2006

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	6
1.1	APOPTOSE	6
1.1.1	GESCHICHTE UND MORPHOLOGIE	6
1.1.2	DAS <i>C. ELEGANS</i> -MODELL DER APOPTOSE	10
1.1.3	APOPTOSE IN HÖHEREN ORGANISMEN	12
1.1.4	CASPASEN ALS ZENTRALE EFFEKTOREN DES APOPTOTISCHEN PROGRAMMS	13
1.1.5	DIE TODESREZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN	16
1.1.5.1	Der CD95-Rezeptor und sein Signalkomplex	17
1.1.6	DAS MITOCHONDRIUM	18
1.1.6.1	Die Bcl-2-Familie	18
1.1.6.2	Typ I- und Typ II-Zellen	21
1.1.7	WEITERE REGULATOREN DER APOPTOSE	21
1.1.7.1	IAPs und IAP-Antagonisten	21
1.1.7.2	AIF	22
1.1.7.3	FLIP	22
1.1.8	DIE ROLLE DER APOPTOSE IN MENSCHLICHEN ERKRANKUNGEN	22
1.2	ZELLTEILUNG UND ZELLZYKLUS	23
1.2.1	GESCHICHTE UND MORPHOLOGIE DES ZELLZYKLUS	23
1.2.2	DER ZELLZYKLUS AUS DER MOLEKULAREN PERSPEKTIVE	25
1.2.3	KONTROLLE DER ZELLTEILUNG DURCH EXTRAZELLULÄRE SIGNALE	26
1.2.3.1	Integrine und Cadherine	27
1.2.3.1.1	Integrine	27
1.2.3.1.2	Cadherine	28
1.2.4	MYC UND SEINE PARTNER	28
1.2.5	CYCLINE UND CYCLIN-ABHÄNGIGE KINASEN	29
1.2.6	CDK-INHIBITOREN DER INK4- UND Cip/Kip-FAMILIE	31
1.2.6.1	INK4-Familie	31
1.2.6.2	Cip/Kip-Familie	31
1.2.7	DAS RETINOBLASTOM-PROTEIN UND DIE E2F-FAMILIE	32
1.2.7.1	Die E2F-Familie	33
1.2.8	P53 UND SEINE EFFEKTOREN	34
1.2.8.1	P53	34
1.3	PROLIFERATION, APOPTOSE UND KREBS	36
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	37
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	38
3.1	MATERIAL	38
3.1.1	GERÄTE	38
3.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	39
3.1.3	CHEMIKALIEN	40
3.1.4	VERWENDETE LÖSUNGEN	42
3.1.5	ANTIKÖRPER	44
3.1.6	BENUTZTE KITS	44
3.1.7	ZELLKULTURMATERIALIEN	44
3.1.8	GELE UND LAUFPUFFER:	45
3.1.9	ZELLINIEN	46
3.1.10	VERWENDETE SOFTWARE	46

3.2	METHODEN	47
3.2.1	ZELLKULTUR	47
3.2.2	ZELLKULTUR	47
3.2.2.1	Auftauen der Zellen	47
3.2.2.2	Passagieren der Zellen	48
3.2.2.3	Einfrieren der Zellen	48
3.2.2.4	Zellzahlbestimmung	48
3.2.2.4.1	Neubauer Zählkammer	49
3.2.2.4.2	Coulter Counter	49
3.2.3	HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN FÜR SDS-PAGE	49
3.2.4	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	50
3.2.4.1	Durchführung	50
3.2.5	SDS-PAGE UND WESTERNBLOT	51
3.2.5.1	Herstellung der Gele und Aufbau der Elektrophoreseapparatur	51
3.2.5.2	Vorbereitung der Proben	51
3.2.5.3	Durchführung des Western-Blot	52
3.2.5.4	Immunfärbung	53
3.2.5.4.1	Durchführung	53
3.2.6	VERGLEICHENDE MESSUNG DER OBERFLÄCHENDICHTE DES CD95-REZEPTORS MITTELS FACS-ANALYSE	54
3.2.6.1	Durchführung	54
3.2.7	ZELLZYKLUSPROFILANALYSE MIT PROPIDIUMIODIDANFÄRBUNG	55
3.2.7.1	Ernten und Fixieren der Zellen	55
3.2.7.2	Färbung	55
3.2.7.3	FACS-Messung	56
3.2.8	BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS MITTELS DES JC-1-FARBSTOFFS	56
3.2.8.1	Durchführung	57
3.2.9	FLUOMETRISCHE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON CASPASE-3, -8 UND -9	57
3.2.9.1	Ernten der Zellen	58
3.2.9.2	Caspase-Assay:	58
3.2.10	RNA-ISOLIERUNG UND MICROARRAYS	58
3.2.10.1	Funktionsweise der Microarrays	59
3.2.10.2	Durchführung der RNA-Isolierung	59
3.2.10.3	Messung der optischen Dichte (OD)	60
3.2.10.3.1	Durchführung	61
3.2.10.4	Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE)	61
3.2.10.4.1	Durchführung der Elektrophorese	61
3.2.11	IMMUNOPRÄZIPITATION DES "DEATH-INDUCING SIGNALING COMPLEX" (DISC)	62
3.2.11.1	Durchführung der Immunpräzipitation	62
4	ERGEBNISSE	64
4.1	MORPHOLOGIE DER ZELLEN	64
4.2	PI-MESSUNGEN	64
4.2.1	DICHT AUSPLATTIERTE RKO-ZELLEN ZEIGEN EINE G ₁ -AKKUMULATION	65
4.2.2	DICHT AUSPLATTIERTE RKO-ZELLEN ZEIGEN EINE GERINGERE SENSITIVITÄT GEGENÜBER CD95L66	
4.3	BEI DÜNN UND DICHT AUSPLATTIERTEN ZELLEN BESTEHT KEIN RELEVANTER UNTERSCHIED IN DER CD95-REZEPTORENDICHTE	67
4.4	DIE ZUSAMMENSETZUNG DES DISC-KOMPLEXES ZEIGT BEI DÜNN- UND DICHT-AUSPLATTIERTEN ZELLEN KEINE UNTERSCHIEDE	69
4.5	CASPASE-8 IST IN DÜNN AUSGESÄTEN RKO-KULTUREN VOR UND NACH CD95L-INKUBATION STÄRKER AKTIV ALS IN KONFLUENTEN KULTUREN	71

4.6	IN SUBKONFLUENTEN RKO-ZELLKULTUREN NIMMT DAS MITOCHONDRIALE MEMBRANPOTENTIAL NACH INKUBATION MIT CD95L STARK AB	72
4.7	IN DICHT AUSGESÄTEN ZELLEN IST EINE HÖHERE KONZENTRATION VON BCL-X_L FESTSTELLBAR	73
4.8	DIE AKTIVITÄT VON CASPASE-9 IST IN DÜNN AUSGESÄTEN ZELLEN ERHÖHT	73
4.9	DÜNN AUSGESÄTE ZELLEN ZEIGEN EINE STARK ERHÖHTE AKTIVITÄT VON CASPASE-3 NACH CD95L-INKUBATION	74
4.10	DICHT AUSPLATTIERTE ZELLEN EXPRIEMIEREN EINE GRÖßERE MENGE DES ZELLZYKLUSINHIBITORS P27, ABER NICHT AN P21	75
4.10.1	P21-WESTERN-BLOT	75
4.10.2	P27 WESTERN-BLOT-ANALYSE	76
4.11	MICRO-ARRAYS	76
4.12	ZELLZYKLUS-PROFILE DER MEDIUMSTAUSCH-VERSUCHE	80
4.13	WEITERE EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES PROTEKTIVEN EFFEKT	82
4.13.1	FCS-FREIES MEDIUM FÜHRT ZU G ₁ -ARREST UND LEICHT ERHÖHTER APOPTOSE	82
4.13.2	DIE ERHÖHUNG DES FCS-ANTEILS FÜHRT ZU KEINEM DEUTLICHEN ANTI APOPTOTISCHEN EFFEKT	83
5	<u>DISKUSSION</u>	85
5.1	DURCH KONFLUENZ UND KONDITIONIERTES MEDIUM WIRD BEI RKO-ZELLEN EIN PROTEKTIVER EFFEKT GEGENÜBER CD95L-INDUZIERTER APOPTOSE VERMITTELT	85
5.2	PROBLEME BEI VERSUCHSANORDNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	87
5.3	CHARAKTERISIERUNG DES PROTEKTIVEN EFFEKTES	89
5.3.1	DER PROTEKTIVE EFFEKT GEHT MIT EINER REDUKTION DER PROLIFERATION EINHER, DIE DURCH P27 VERURSACHT SEIN KÖNNTE	92
5.3.2	BCL-X _L -EXPRESSION UND CASPASIN-SUPPRESSION BEI DURCH KONFLUENZ PROTEKTIONIEREN ZELLEN	95
5.4	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG:	98
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	100
7	<u>DANKSAGUNG</u>	118
8	<u>LEBENS LAUF</u>	119
9	<u>ANHANG</u>	120
9.1	CYTOKINE-ARRAY	120
9.2	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	122

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Geschichte und Morphologie

Die Bezeichnung "Apoptose" stammt aus dem Griechischen, wo das Wort $\alpha\pi\omicron\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$ (apoptosis) soviel wie "abfallen" (griech.: $\alpha\pi\omicron$ = weg, ab; $\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$ = fallen) bedeutet und zur Bezeichnung des Laubfalls im Herbst benutzt wurde.

In der allgemeinen medizinischen Terminologie fand das Wort auch schon im Altertum durch Hippokrates (um Gewebnekrosen bei Knochenbrüchen zu benennen; 460-370 v. Chr.) und Galen (als Begriff für das Abfallen von Krusten; 129-199 n. Chr.) Verwendung.

Im 19. Jahrhundert wurde es erstmals von C. Vogt in einer Veröffentlichung von 1842 als Bezeichnung für eine physiologische Form des Zelltods während der Ontogenese benutzt [Vogt, 1842].

Obgleich die histologischen Veränderungen, die heute als Merkmale der Apoptose angesehen werden, zum Teil schon bei Vogt beschrieben worden sind, führten doch erst Veröffentlichungen aus den Jahren 1972 von Kerr et al. [Belka and Budach, 2002; Kerr et al., 1972] und 1977 von Horvitz et al. [Kerr, 2002] zu einer weitreichenderen Beachtung des Phänomens der Apoptose. Dieser Entwicklung wurde durch technische Fortschritte wie der Elektronenmikroskopie und der Gentechnik der Weg geebnet. Die noch immer zunehmende Bedeutung der Apoptoseforschung wird durch die grosse Menge an Veröffentlichungen verdeutlicht. So wurden bei PubMed (eine kostenlose, englischsprachige textbasierte Datenbank, zu erreichen über: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>) Anfang 2004 über 79.000 Publikationen zum Suchwort „apoptosis“ (engl. für Apoptose) aufgelistet, davon erschienen allein über 13.000 im Jahre 2003.

Gemeinhin werden bei Metazoen die Begriffe "Apoptose" und "programmierter Zelltod" synonym verwendet, obwohl die Apoptose als ein spezifisches Modell des programmierten Zelltods anzusehen ist. Dieses beschreibt einen aktiven, genetisch programmierten und evolutionär stark konservierten Signalweg, der durch verschiedene Stimuli (z.B. Todesliganden, ionisierende Strahlung) oder das Ausbleiben gewisser extrazellulärer Signale (z.B. Wachstumsfaktoren, Extrazellulärmatrix) aktiviert werden kann und im Untergang sowie der Beseitigung der betroffenen Zelle resultiert.

Es handelt sich bei der Apoptose um ein genetisch gesteuertes Programm, das in vielen Organsystemen eine antagonistische Funktion zur Proliferation einnimmt und somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Zellneubildung und Zelltod ist.

Die Unterschiede zwischen der Apoptose und dem nicht gesteuerten und unphysiologischen Zelltod, der Nekrose, sind in Tabelle 1.1 gegenübergestellt. Die spezifisch der Apoptose zugeordneten Charakteristika können in mikroskopisch sichtbare Erscheinungen sowie in molekulare Veränderungen der Zelle eingeteilt werden.

Apoptose	Nekrose
<ul style="list-style-type: none"> • genetisch vorgegebener Prozess • die Zellmembran bleibt zunächst intakt, doch die Asymmetrie wird aufgehoben: Exposition von Phosphatidylserin an der Aussenseite • meist sind einzeln liegende Zellen im adulten Gewebeverband betroffen • keine Entzündungsreaktion, Phagozytose der betroffenen Zellen durch Makrophagen oder Nachbarzellen • von Transkription und Translation abhängiger Vorgang • Abbau der DNA durch apoptose-spezifische Nukleasen führt zum Auftreten von DNA-Fragmenten ganz bestimmter Länge (im DNA-Gel: DNA-Leiter, engl. "laddering") 	<ul style="list-style-type: none"> • Absterben der Zelle ist in der Regel unphysiologisch • strukturelle Schäden an der Zellmembran führen zum Einstrom von Extrazellulärflüssigkeit und schliesslich zum osmotisch bedingten Aufbrechen der Zelle • zusammen liegende Zellgruppen bzw. Gewebe sind betroffen • durch Inhaltsstoffe der Zelle hervorgerufene Entzündungsreaktion mit Einwandern von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten • weitgehend unabhängig von Transkription und Translation • unspezifischer Abbau der DNA resultiert in Fragmenten unterschiedlichster Länge (im DNA-Gel: "smear")

Tabelle 1.1: Vergleich von Apoptose und Nekrose [Belka and Budach, 2002; Fraser et al., 1996; Krammer, 1999; Kroemer et al., 1995]

Die mikroskopischen Veränderungen apoptotischer Zellen wurden von Kerr et al. zwischen 1962 und 1964 zuerst in histologischen Präparaten ischämischer Lebern bemerkt und dann in den Jahren 1971 und 1972 in der Nebennierenrinde und in Brusttumoren detailliert charakterisiert [Kerr et al., 1972; Sulston and Horvitz, 1977]. Neben typischen nekrotischen Zellen bemerkten Kerr et al. einzeln und verstreut liegende Zellen, die ein stark kondensiertes Chromatin und blasenartige Zytoplasmaabschnürungen mit Chromatineinschlüssen aufwiesen. In den folgenden Jahren wurde diese von der Nekrose zu unterscheidende Art des Zelltods in verschiedenen anderen menschlichen und tierischen Geweben näher beschrieben und untersucht [Holbrook N.J., 1996; Wyllie, 1992]. Das spezifische Verhalten einer apoptotischen Zelle kann folgendermaßen beschrieben werden: adhärente Zellen lösen sich aus dem Zellverband, schrumpfen, und bilden schliesslich die oben erwähnten zytoplasmatischen Abschnürungen aus (engl. „membrane blebbing“, auch als Zeiosis bezeichnet). Dabei bleiben Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien histologisch zunächst weitestgehend intakt (trotzdem kommt es zum Austritt

von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, s. Abschnitt 1.1.6), schwellen jedoch an, während das Chromatin sichelförmig an der Kernmembran, welche auch Abschnürungen ausbildet, aggregiert. In Abbildung 1.2 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer apoptotischen Zelle mit den typischen Abschnürungen zu sehen [Holbrook N.J., 1996; Malorni, 2002].

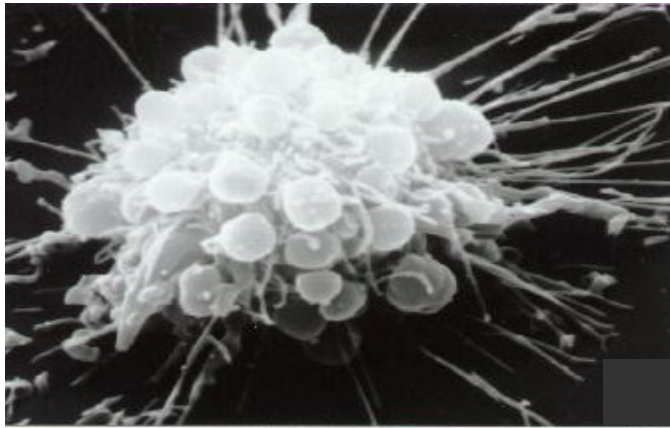


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer apoptotischen Epithelzelle [Malorni, 2002]. Die Zelle erscheint abgerundet, eine Vielzahl apoptotischer Körperchen schnüren sich ab.

In vivo werden die aus der Fraktionierung der Apoptose-durchlaufenden Zelle hervorgehenden, sogenannten apoptotischen Körper (engl.: apoptotic bodies) von Makrophagen, aber auch von Nachbarzellen phagozytiert und im Weiteren in deren Lysosomen abgebaut. *In vitro* schwellen die apoptotischen Körper in Abwesenheit phagozytierender Zellen letztendlich an und lysieren – ein Vorgang, der als "sekundäre Nekrose" [Savill, 1997] bezeichnet wird, da er morphologisch der Nekrose ähnelt.

Die äußere Zellmembran bleibt bei der Apoptose allerdings vorerst unversehrt und verhindert damit das Austreten von Zellbestandteilen, von denen einige *in vivo* als Entzündungsmediatoren fungieren können (z.B. K^+ , H^+ , ATP, u.a.), in den Extrazellulärraum. Dies erklärt, weshalb der apoptotische Zelltod *in vivo* im Gegensatz zur Nekrose üblicherweise keine Entzündungsreaktion mit Invasion neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten nach sich zieht [Duvall et al., 1985; Savill, 1997].

Die auffälligsten spezifischen molekularen Veränderungen, die bei der Apoptose in Säugerzellen auftreten und direkt oder indirekt aus der Aktivierung bestimmter Proteasen, vornehmlich Cystein-Proteasen aus der sogenannten ICE (engl. interleucin 1 β -converting-enzyme)-Familie, resultieren, sind vor allem die Exposition von Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche [Duvall et al., 1985], die Proteolyse von mehr als 200 intrazellulären Proteinen (z.B. PARP, ein an DNA-Reparaturprozessen beteiligtes Enzym; [Gu et al., 1995; Kaufmann et al., 1993; Schreiber et al., 1995]), und der schrittweise Abbau der DNA zuerst in 50-300 kbp- und später in 180 bp-Fragmente - ein Vorgang der als internukleosomale

Fragmentierung oder auch als „DNA-laddering“ bezeichnet wird [Oberhammer et al., 1993; Wyllie, 1980].

Das Modell, das bisher für die Funktionsmechanismen der Apoptose entworfen wurde, zeigt eine anderen Signalwegen vergleichbare Signalkaskade, die in intrinsische und extrinsische Kaskade unterteilt werden kann, und der Verstärkung und Regulation eines apoptotischen Signals dient (siehe Abbildung 1.4). Die extrinsische Kaskade wird durch die Interaktion von Todesrezeptorliganden und ihren Rezeptoren (Todesrezeptoren; engl.: death receptors) ausgelöst. Die intrinsische Kaskade wird entweder durch den Mangel an lebensnotwendigen Überlebensfaktoren (engl. „survival factors“) wie Wachstumsfaktoren, durch das Fehlen von Adhäsion an Extrazellulärmatrix (engl. **extracellular matrix**; ECM), oder durch Schädigungen des Erbguts, z.B. aufgrund ionisierender Strahlung oder alkylierender Substanzen, ausgelöst. Die intrinsische Kaskade involviert immer das Mitochondrium. Die extrinsische und die intrinsische Kaskade münden in einen gemeinsamen Signalweg, der schlussendlich zur Auslösung der Apoptose führt [Barnhart et al., 2003].

Beide Signalübertragungswege können je nach Zelltyp sowohl unabhängig als auch abhängig voneinander ablaufen. Ob in einer Zelle das apoptotische Programm ausgelöst wird oder nicht, hängt nach heutigen Erkenntnissen von vielen verschiedenen Faktoren ab. Diese sind einzuteilen in pro-apoptotisch und anti-apoptotisch.

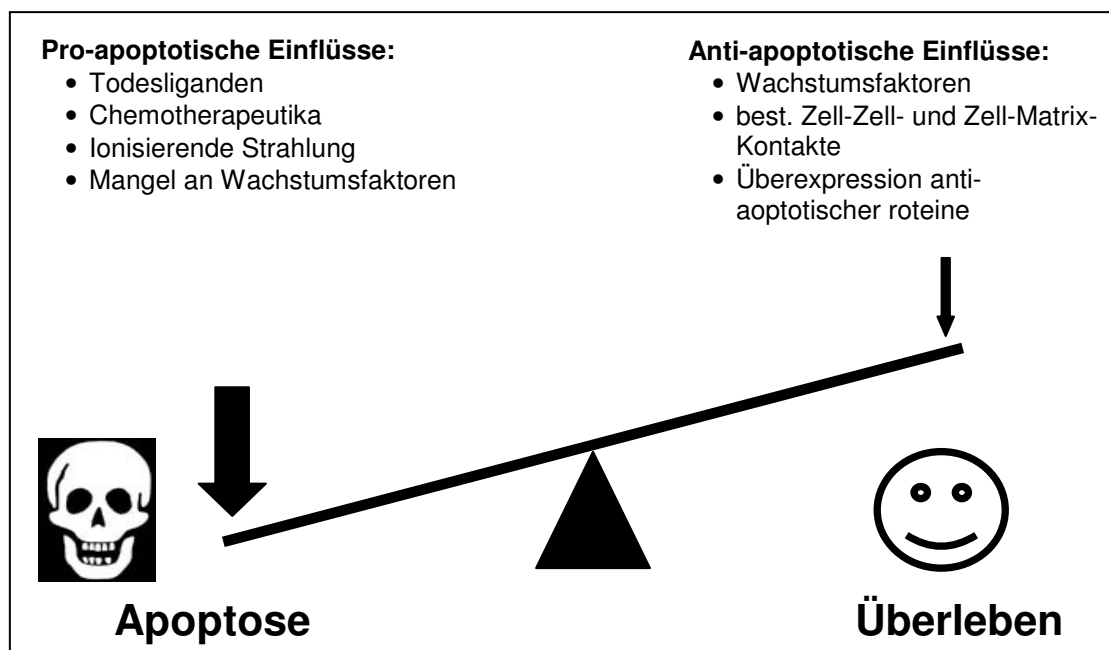


Abbildung 1.3: Modell der Apoptoseauslösung. Verschiedene Faktoren wirken auf die „Leben oder Tod“-Entscheidung ein.

Die Entscheidung über Leben und Tod einer einzelnen Zelle ergibt sich aus der Summe der pro- und der anti-apoptotischen Einflüsse, denen sie unterliegt. Vergleichbar mit einer Wippe, die entweder auf der einen oder der anderen Seite zu Boden sinkt, ist die Zelle entweder dazu determiniert in programmierten Zelltod überzugehen oder weiterzuleben. Zur Verdeutlichung dieses Modells soll Abbildung 1.3 beitragen.

1.1.2 Das *C. elegans*-Modell der Apoptose

Auch während der Ontogenese tritt das Phänomen der Apoptose häufig auf, weshalb entwicklungsbiologische Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der als gut untersuchter genetischer Modellorganismus etabliert ist, zur Entdeckung der ersten Apoptosegene führten. Dies war die Voraussetzung für grundlegende Einsichten sowohl in die molekulare Funktionsweise als auch in die Bedeutung der Apoptose in ontogenetischer Hinsicht. Im Folgenden wurde ein erstes, grundlegendes Modell der molekularen apoptotischen Maschinerie aufgestellt, das sich auch auf höhere Lebewesen übertragen lässt. In diesem Zusammenhang wurden Sydney Brenner, Robert Horvitz und John Sulston im Jahr 2002 für ihre Untersuchungen an *C. elegans* mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie geehrt [McCarthy, 2003]

Es ist bekannt, dass während der Entwicklung der Zwitterform dieses Nematoden stereotyp genau 131 von 1090 gebildeten somatischen Zellen absterben und zwar durch programmierten Zelltod [Sulston and Horvitz, 1977; Sulston and Horvitz, 1981]. Durch Mutationsanalysen konnten in *C. elegans* verschiedene für das apoptotische Programm entscheidende Gene identifiziert werden. Die wichtigsten sind *ced3*, *ced4* und *ced9* (engl. **cell death abnormal**), deren Genprodukte unterschiedliche Funktionen bei der Durchführung der Apoptose erfüllen [Horvitz and Sulston, 1980; Yuan et al., 1993]. Während *ced3* und *ced4* pro-apoptotische sind, ist *ced9* ein anti-apoptotisches Gen.

Mutationen, die *ced3* und *ced4* inaktivieren, führen genau wie die künstliche Überexpression von *ced9*, zur kompletten Inhibition des programmierten Zelltods, während Mutationen, die *ced9* inaktivieren, zu massivem Auftreten von Apoptose und schliesslich zum Absterben des Embryos führen.

Das Ced3-Protein ist eine Protease, deren aktives Zentrum einen Cysteinrest aufweist und die Substrate carboxyterminal nach Aspartat-Resten spaltet. Ced3 wird auch als Caspase bezeichnet (engl. **cysteiny aspartate specific Protease**).

Ced3 wird in *C. elegans* (wie Caspasen in anderen Organismen auch) als katalytisch inaktives Zymogen gebildet. Die Aktivierung dieses Zymogens erfolgt in zwei Prozessierungsschritten.

Zuerst wird eine aminoterminal Prodomäne durch verschiedene Mechanismen abgespalten, daraufhin folgt eine Spaltung des verbleibenden Polypeptids in eine grosse und eine kleine Untereinheit. Aus diesen Teilen kann sich ein enzymatisch aktives Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit zwei katalytischen Zentren bilden. Die bei der Prozessierung betroffenen Spaltstellen sind Caspase-spezifisch, d.h. es ist eine Trans-Aktivierung möglich (siehe Abschnitt 1.1.4).

Ced4 ist nach den bisherigen Kenntnissen ein Adapterprotein, das sowohl mit Ced3 als auch mit Ced9 interagiert. Interaktion mit Ced3 führt zur Aktivierung der Ced3-Protease, wofür eine ATP-Bindungsdomäne von Ced4 essentiell ist.

Das anti-apoptotische Ced9 hingegen bindet und inaktiviert Ced4, was eine Hemmung der Apoptose bewirkt. Ein lineares Modell der Apoptose bei *C. Elegans* ist in Abbildung 1.4 abgebildet.

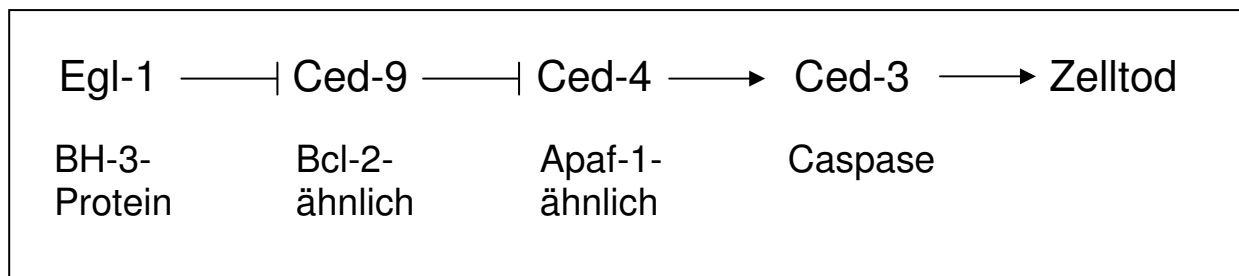


Abbildung 1.4: Grafisches Modell der Apoptose bei *C. elegans*. Egl-1, ein BH3-Protein (siehe Abschnitt 1.1.6.1) hemmt die anti-apoptotisch wirkende Hemmung von Ced9 auf Ced4. Es kommt zur Aktivierung der Ced3-Protease durch Ced4 und konsekutiv zum programmierten Zelltod [Belka and Budach, 2002; Horvitz, 2003; Krammer, 1999]

Es konnten zu den *C. elegans* Apoptoseproteinen homologe Moleküle in anderen Spezies identifiziert werden. Ced3-ähnliche Caspasen sind in vielen Variationen in Säugern zu finden. Beim Menschen sind bisher etwa 11 Caspasen entdeckt worden, wobei die erste identifizierte humane Caspase (Caspase-1, engl. Interleukin-1 β converting enzyme, ICE) allerdings keine direkte Verbindung zur Apoptose hat, sondern an der Prozessierung von inflammatorischen Cytokinen beteiligt ist [Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993].

Als Ced4-Homolog konnte Apaf-1 (engl. **a**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor-1) identifiziert werden, das beim Menschen für die Aktivierung der Caspase-9 verantwortlich ist [Zou et al., 1997]. Das Ced9-Protein von *C. elegans* besitzt grosse Ähnlichkeit zum humanen Bcl-2-Protein (Genprodukt des **B**-cell **l**ymphoma-2 Onkogens). Ein Indiz für die starke Konservierung der Apoptose-Maschinerie und damit auch für ihre entscheidende Bedeutung für das Überleben der Spezies ist die Tatsache, daß in *ced9*-Mutanten Bcl-2 die Funktion von Ced9 übernehmen kann (auch als Komplementation bezeichnet, engl. „functional rescue“; [Gaumer et al., 2000; Hengartner and Horvitz, 1994]).

Neben den drei Apoptose-relevanten Genen *ced3*, *ced4* und *ced9* ist auch noch das Gen *egl-1* zu nennen, dessen Genprodukt in *C. elegans* an Ced9 bindet und dessen apoptosehemmende Funktion inhibiert. Egl-1 hat grosse Ähnlichkeiten zu den BH3-Proteinen aus der Bcl-2-Familie, die weiter unten besprochen wird (siehe Abbildung 1.4; [Conradt and Horvitz, 1998]).

1.1.3 Apoptose in höheren Organismen

Es kommen verschiedene Homologe dieser Apoptose-Gene in höheren Lebensformen vor, fügen sich bei diesen aber in ein weit komplexeres Regulationssystem ein, was sich nicht nur durch die bei höheren Lebensformen weitreichendere apoptotische Gestaltung der Ontogenie erklärt, sondern auch durch die grössere Diversität der Zellarten.

Es gibt zahlreiche Beispiele für die Bedeutung der Apoptose bezüglich der Ontogenese: die Rückbildung der Schwanzflosse bei der Metamorphose von der Kaulquappe zum Frosch geschieht durch Beseitigung der Zellen durch Apoptose. Bei der embryonalen Entwicklung des Menschen bewirkten Apoptoseprozesse beispielsweise die Herausbildung von einzelnstehenden Fingern aus der embryonalen Handplatte, aber auch die Strukturierung des zentralen Nervensystems, bei der 20-80% der bei Geburt vorhandenen Neuronen durch Apoptose absterben [Holbrook N.J., 1996; Kerr et al., 1974].

Die Apoptose spielt nicht nur bei der Ontogenese eine entscheidende Rolle, auch im vollständig entwickelten Organismus besteht kontinuierlich der Bedarf, überzählige oder für den Gesamtorganismus gefährliche Zellen zu beseitigen. An erster Stelle kann hier die Vernichtung von Virus-infizierten Zellen durch Apoptose, die der Eindämmung des Virus dient, genannt werden - ein Schutzmechanismus, der anscheinend auch bei Bakterien beobachtet werden kann und womöglich die phylogenetisch älteste Funktion des programmierten Zelltods darstellt [Lewis, 2000]. Beim Menschen findet dies durch das Eingreifen von CD8⁺-T-Lymphozyten, die körperfremde, auf MHC-I-Komplexen präsentierte Proteinfragmente erkennen und über Granzyme B und den CD95-Signalweg Apoptose in infizierten Zellen auslösen können, statt. Offenbar stellt die Virusinfektion selbst auch schon einen Apoptose-induzierenden Stimulus dar, der von humanpathogenen Viren mit Hilfe von anti-apoptotischen Onkogenen (*v-onc*; z.B. *v-myc*, *v-src*, *v-ras* etc.) umgangen werden kann [Birnbauer et al., 1994; Krammer, 2000].

Auch für das Immunsystem höherer Organismen hat Apoptose eine immense Bedeutung. Autoreaktive oder nicht funktionstüchtige Thymozyten werden im Thymus nach positiver und

negativer Selektion in die Apoptose getrieben [Sebzda et al., 1999], ebenso wie nicht-funktionelle B-Zellen [Craxton et al., 1999].

Immunreaktionen werden beendet, indem die zuvor klonal expandierten Lymphozyten den sog. Aktivierungs-induzierten apoptotischen Zelltod (engl. activation-induced cell death, AICD) einleiten [Berzins et al., 1999; Dhein et al., 1995; Krueger et al., 2003].

Weiterhin sind apoptotische Mechanismen für die Beseitigung von entarteten Zellen, die andernfalls zu Krebs führen könnten, verantwortlich. Einerseits induzieren proliferationssteigernde Onkogene (wie c-Myc, E2F1 oder Cyclin E) neben der Zellteilung gleichzeitig Apoptose, andererseits werden entartete Zellen von Immunzellen erkannt und durch Apoptose beseitigt [Evan et al., 1992; Grimm et al., 1982; Harrington et al., 1994; Zornig et al., 2001].

Anscheinend führen vererbte somatische Mutationen von Apoptose-relevanten Genen zu einem erhöhten Krebsrisiko (Darmkrebs, Brustkrebs) [Venkateswarlu et al., 2002]. Umgekehrt konnten auch in einer Vielzahl von Malignomen inaktivierende Mutationen von pro-apoptotischen (z.B. CD95 oder p27 [Fredersdorf et al., 1997; Loda et al., 1997; Thomas et al., 1998]) und auch die Überexpression von anti-apoptotischen Genen, wie z.B. *bcl-2* [Hanada et al., 1993], nachgewiesen werden, was nahelegt, dass Krebserkrankungen sich auf der Basis einer ungehemmten Proliferation in Kombination mit erhöhter Apoptoseresistenz entwickeln. In Kapitel 1.3 wird eingehender über den Zusammenhang von Krebs und Apoptose eingegangen werden (siehe Abschnitt 1.3)

Die wichtigsten Bestandteile der humanen apoptotischen Maschinerie werden in den folgenden Abschnitten detailliert besprochen.

1.1.4 Caspasen als zentrale Effektoren des apoptotischen Programms

Caspasen können als Schlüsselproteine der apoptotischen Kaskade angesehen werden. Ihre auf die Ligandenbindung folgende Aktivierung stellt eines der ersten intrazellulären Ereignisse der apoptotischen Kaskade bei der CD95L-induzierten Apoptose dar. Eine Einteilung der elf bisher beim Menschen entdeckten Caspasen kann phylogenetisch anhand der Länge der amino-terminalen Prodomäne in zwei Homologie-Gruppen vorgenommen werden, und zwar in Caspasen mit langer oder mit kurzer Prodomäne [Cohen, 1997]. Alternativ kann eine Einteilung der Caspasen hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Funktion in drei Gruppen erfolgen (siehe Tabelle 1.2; [Nicholson and Thornberry, 1997; Thornberry, 1997; Wolf and Green, 1999]): zur ersten der drei Gruppen werden die Caspasen

gezählt, die bei der Prozessierung von Cytokinen beteiligt sind, also eigentlich nicht direkt mit Apoptose assoziiert sind. Die Apoptose-relevanten Caspasen werden einerseits in die Gruppe der Effektor-Caspasen, und andererseits in die Gruppe der Initiator-Caspasen unterteilt. Als Initiator-Caspasen werden Caspasen bezeichnet, die die apoptotische Caspasekaskade beginnen und ihrerseits Effektorcaspasen spalten. Jede Caspase hat hierbei eine Vielzahl von Substraten, beispielsweise aktiviert Caspase-8 nicht nur direkt die Effektor-Caspase-3, sondern spaltet das Bcl-2-Protein Bid zu tBid (truncated Bid), welches dann am Mitochondrium für die Permeabilisierung der äusseren Mitochondrienmembran für Cytochrom C mitverantwortlich ist (siehe Abschnitt 1.1.6.1). Initiator-Caspasen können wiederum aufgrund bestimmter Protein-Interaktions-Motive (wie z.B. DED, CARD, s.u.) unterteilt werden.

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen findet an grossen Signalkomplexen, wie dem CD95-assoziierten DISC (engl. **d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex) oder dem Apoptosom, durch induzierte Annäherung (engl. induced proximity) von zwei Zymogenen statt, deren minimale Aktivität (etwa 1% der Aktivität des aktiven Tetramers) ausreicht, um die Prozessierung auszulösen [Boatright et al., 2003].

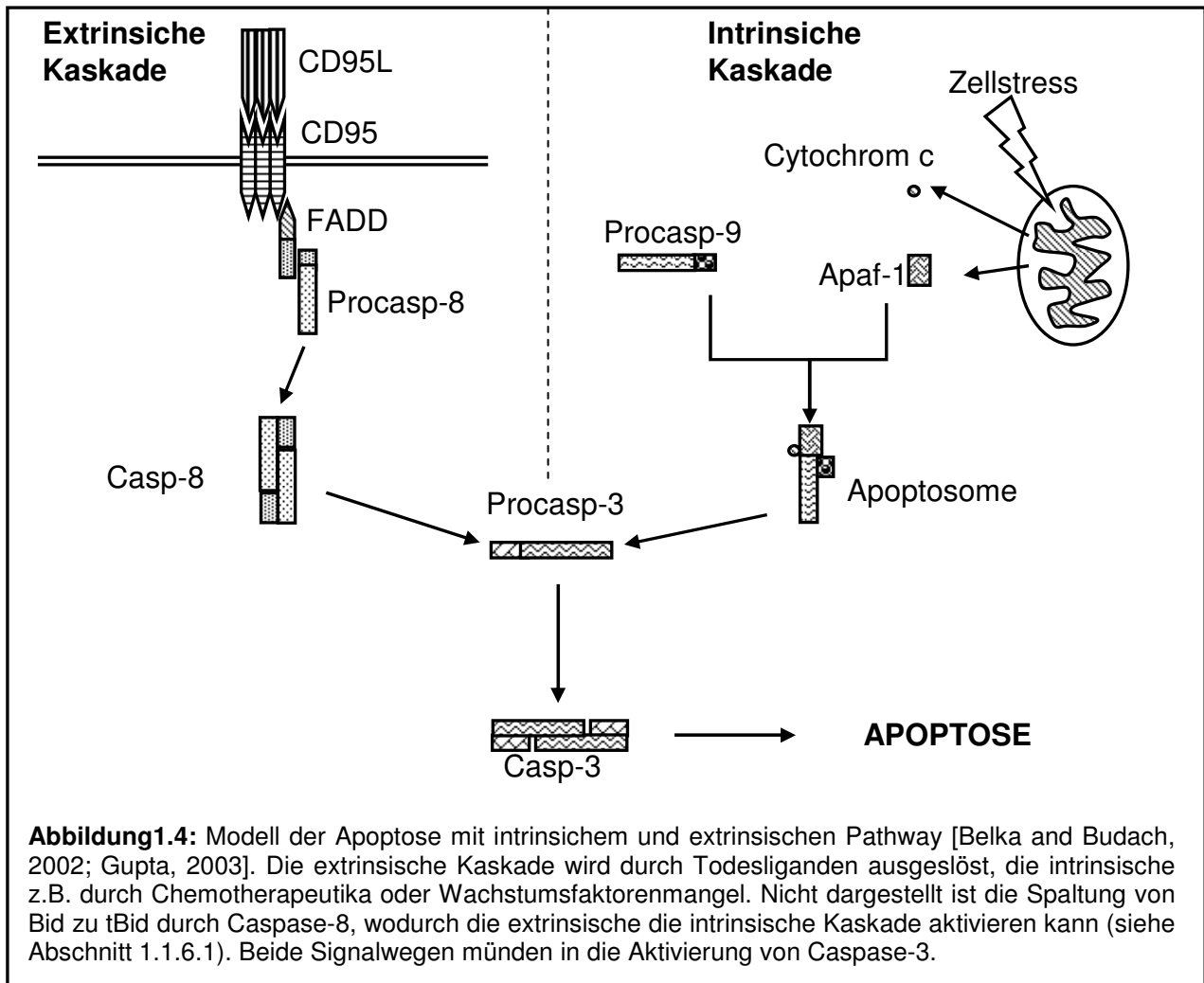
Effektorcaspasen (engl. "executioner caspases") führen zur Proteolyse verschiedener intrazellulärer Polypeptide, zu denen Strukturelemente des Cytosols und des Kerns, Bestandteile des DNA-Reparatur-Systems und verschiedene Proteinkinasen gehören. Dadurch kommt es zu Apoptose, wie sie weiter oben schon beschrieben wurde [Fischer et al., 2003; Stroh and Schulze-Osthoff, 1998].

Die Spaltungsreaktionen werden durch einen Cystein-Rest, der in einem konserviertem Motiv (Aminosäuresequenz QACXG) im katalytischen Zentrum liegt, und durch einen Histidin-Rest gewährleistet. Die Spaltung erfolgt in der Aminosäuresequenz des Substrats stets nach einem Aspartat-Rest, der in einer tetrameren Erkennungssequenz liegt, wobei sich die verschiedenen Caspasen hinsichtlich der bevorzugten Erkennungssequenzen unterscheiden (siehe Tabelle 1.2 [Fischer et al., 2003; Wolf and Green, 1999]).

Zytokin-Prozessierende Caspasen	Länge der Prodomäne, und Bindungsdomäne	Bevorzugt gespaltenes Tetrapeptid
Caspase-1	lang, CARD	(W/Y/F)EHD
Caspase-4	lang, CARD	(W/L/F)EHD
Caspase-5	lang	(W/L/F)EHD
mCaspase-11*	lang	nicht bekannt
mCaspase-12*	lang	nicht bekannt
Caspase-13	lang	nicht bekannt
mCaspase-14*	kurz	nicht bekannt
Initiator-Caspasen		
Caspase-2	lang, CARD	DXXD
Caspase-8	lang, DED	(L/V/D)EXD
Caspase-9	lang, CARD	(L/V/D)EXD
Caspase-10	lang, DED	nicht bekannt
Effektor-Caspasen		
Caspase-3	kurz	DEXD
Caspase-6	kurz	(V/T/I)EXD
Caspase-7	kurz	DEXD
Tabelle 1.2: Caspasen, ihre Prodomäne und die bevorzugte Schnittstellen [Wolf and Green, 1999]. Die mit Stern und "m" gekennzeichneten Caspasen sind bisher nur bei der Maus (<i>Mus musculus</i>) untersucht worden, bzw.sind nur dort vorhanden.		

Prinzipiell nimmt das apoptotische Signal, das z.B. durch CD95-CD95-Liganden-Interaktion (siehe Abschnitt 1.1.5) verursacht wurde, seinen Anfang mit der Aktivierung einer „apikalen“ Initiatorcaspase, und wird durch die nachfolgende Aktivierung der Effektorcaspasen ausgeführt (siehe Abbildung 1.4).

Der Knock-Out bestimmter Caspasen der Maus führt nicht zwangsläufig zu einem deutlichen Phänotyp. Es scheint bei Säugetieren eine gewisse funktionelle Redundanz unter den Caspasen zu bestehen [Sadowski-Debbing et al., 2002].



1.1.5 Die Todesrezeptoren und ihre Liganden

Todesrezeptoren (engl.: death receptors, DRs) gehören zur Familie der TNF (engl. **tumor necrosis factor**)-Rezeptoren. Die Mitglieder der grossen TNF-Rezeptor-Superfamilie sind Transmembranproteine des Typs I, das heißt, dass ihr Carboxy-Terminus - im Gegensatz zu dem Typ II-Transmembranproteinen - auf der cytosolischen Seite der Zellmembran zu finden ist. Die extrazellulär liegenden Anteile der Rezeptoren sind häufig glykosyliert. Charakteristisch für diese große Familie von Rezeptoren ist, dass sie in ihren Ligandenbindungsdomänen zwei bis sechs cysteinreiche Sequenzwiederholungen aufweisen [Armitage, 1994].

Die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie, die als Todesrezeptoren fungieren, besitzen auf der cytoplasmatischen Seite eine Domäne, die sich in ähnlicher Form auch in verschiedenen anderen Apoptose-assoziierten Proteinen wiederfindet und durch homophile

Interaktionen an der Weiterleitung des apoptotischen Signals beteiligt ist, weshalb sie als Todesdomäne (engl.: death domain, DD) bezeichnet wird [Ashkenazi and Dixit, 1998].

Komplementär zu den Todesrezeptoren existiert eine Gruppe strukturell verwandter Liganden, die zu der Gruppe der Typ II-Transmembranproteine gehören, jedoch auch in löslicher, homotrimerer Form vorkommen, wenn sie von der Membran abgespalten werden, was durch Metalloproteasen erreicht wird [Kayagaki et al., 1995; Mitsiades et al., 2001]. Einige der Todesrezeptoren, die eine Todesdomäne enthalten, und ihre Interaktionspartnern sind in Abbildung 1.5 abgebildet.

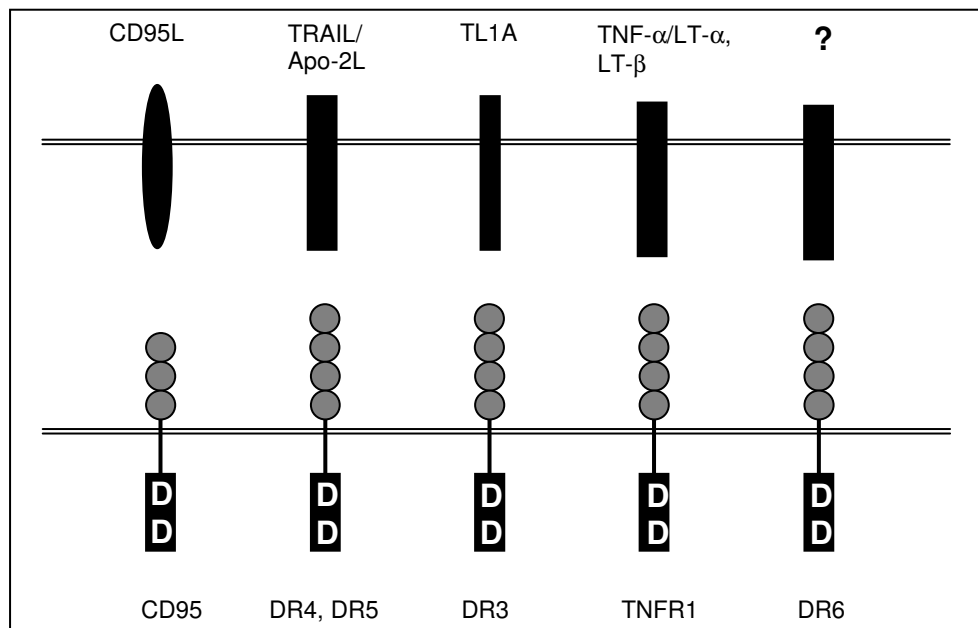


Abbildung 1.5: Todesrezeptoren aus der TNF-R-Superfamilie (unten) und deren Liganden (oben). Cystein-reiche Sequenzwiederholungen sind als Kreise dargestellt. [Armitage, 1994; Belka and Budach, 2002; Krammer, 1999]

1.1.5.1 Der CD95-Rezeptor und sein Signalkomplex

Als Prototyp eines Todesrezeptors soll hier der 1989 entdeckte CD95/Fas/Apo-1 im Speziellen besprochen werden. Der etwa 52kDa schwere CD95-Rezeptor wird auf fast allen Körperzellen exprimiert und liegt hauptsächlich in monomerer Form vor [Itoh et al., 1991; Trauth et al., 1989]. Die Bindung des CD95-Liganden führt zur Stabilisierung einer trimeren Zustandsform, in der sich bei Abwesenheit des Liganden nur ein sehr geringer Anteil der Rezeptoren befindet [Chan et al., 2000].

Konformationsänderungen des intrazellulären Anteils von CD95 ermöglichen die Bindung von Caspase-8 und -10 über das Adapterprotein FADD (engl. **F**as-associated protein with a **d**eath **d**omain; [Boldin et al., 1995; Wallach et al., 1996]). Dieses Protein zeichnet sich durch

den Besitz einer DD und einer DED (engl. **d**eath **e**ffector **d**omain) aus, beides helikal aufgebaute Domänen, die zu homophilen Interaktionen fähig sind. Die Interaktion des Rezeptors mit FADD findet über die DD statt, während die Interaktion zwischen FADD und den Caspasen über eine homophile Interaktion der DED zustande kommt.

Durch Bindung der Caspasen an FADD kommt es zu einer Annäherung der einzelnen Caspasmoleküle, die dazu führt, dass diese sich transkatalytisch aktivieren (engl. induced proximity) und, indem die dann entstehenden aktiven Caspase-Tetramere im Cytosol verschiedene Zielproteine spalten, die apoptotische Kaskade in Gang setzen. Der grosse, aus CD95, FADD und den Caspasen-8 und -10 bestehende Proteinkomplex wird als DISC (engl. **d**eath-**i**nducing **s**ignaling **c**omplex) bezeichnet [Peter and Krammer, 2003]. Bei CD95 und einigen anderen DRs wurden pleiotrope Effekte nachgewiesen [Abreu-Martin et al., 1999; Zornig et al., 1998]. Das heißt, dass von ihnen nicht nur pro-apoptotische Signalwege initiiert werden, sondern auch solche mit anderen Wirkungen, wie z.B. anti-apoptotische Effekte beim TNF-Rezeptor über Aktivierung des nukleären Faktors κ -B (NF- κ B), aber anscheinend auch Proliferations-fördernde Effekte - z.B. sind FADD-defiziente T-Zellen in ihrer Proliferation gestört [Newton et al., 2000; Walsh et al., 1998; Zornig et al., 1998].

1.1.6 Das Mitochondrium

Die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs führt zu Veränderungen an den Mitochondrien, die einen Austritt von im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisierten pro-apoptotischen Proteinen - vor allem des an der Atmungskette beteiligten Cytochrom c, aber auch von Proteinen wie Smac/DIABLO (engl. **s**econd **m**itochondrial **a**ctivator of **c**aspases/**d**irect **I**AP **b**inding protein with **l**ow pI) und AIF (engl. **a**poptosis **i**nducing **f**actor) – bewirken. Es ist bisher nicht vollständig geklärt, ob die beobachtete Aufhebung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) eine Nebenerscheinung oder eine Voraussetzung hierfür ist [Gupta, 2003; von Ahsen et al., 2000].

1.1.6.1 Die Bcl-2-Familie

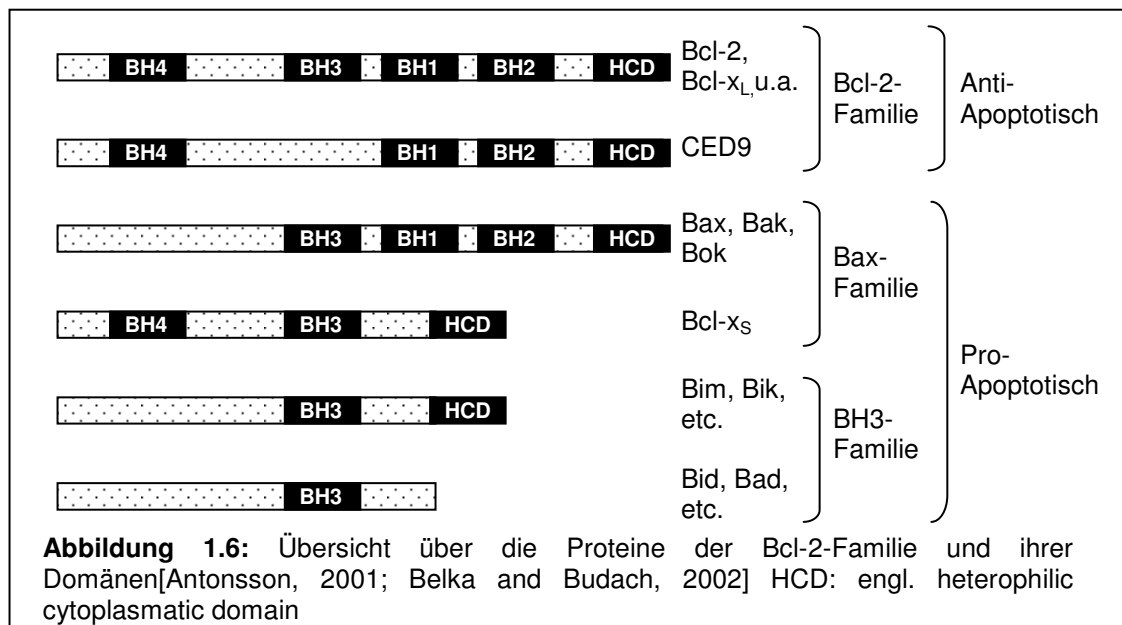
Unmittelbar reguliert wird die Permeabilität des Mitochondriums durch Proteine der Bcl-2-Familie, benannt nach dem (bereits erwähnten) Genprodukt des Onkogens *bcl-2* (engl. **B**-cell **l**ymphoma), welches als erstes CED9-Homolog identifiziert wurde [Hengartner and Horvitz, 1994; Vaux et al., 1988]. Die Überexpression von Bcl-2 tritt gehäuft bei follikulären B-Zelllymphomen, z.T. infolge einer Chromosomentranslokation t(14,18), aber anscheinend

auch durch Hypomethylierung verursacht auf [Hanada et al., 1993]. Insgesamt wird eine Bcl-2-Überexpression bei circa 50 % aller untersuchten Malignome gefunden.

Die durch strukturelle Homologien charakterisierten (BH-Domänen, BH1 bis BH4 [Bcl-2-Homology]) Mitglieder der Bcl-2-Familie werden in drei Subfamilien unterteilt (siehe Abbildung 1.6).

Die Mitglieder der Bcl-2-Subfamilie besitzen alle vier BH-Domänen (Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w) oder nur BH1 und BH2 (Mcl-1 und A1), während Bax, Bak und Bok die Domänen BH1, BH2 und BH3 enthalten.

Bei den Mitgliedern der BH3 Subfamilie ist nur die BH3-Domäne zu finden (siehe Abbildung 1.6.).



Obwohl die Wirkmechanismen der verschiedenen Bcl-2-Proteine noch nicht vollständig verstanden wird, ist bekannt, dass die anti-apoptotischen Mitglieder den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit auch das Austreten von Cytochrom c verhindern können, während die pro-apoptotischen dies begünstigen. Eine ausschlaggebende Rolle scheinen dabei Heterodimerisierungen der verschiedenen Bcl-2-Proteine zu spielen [Korsmeyer et al., 1993; Sattler et al., 1997].

Anders als bei normalen Zellen kann bei Bax/Bak-defizienten Zellen durch BH3-Proteine allein keine Apoptose ausgelöst werden. Bax und Bak setzen also Cytochrom c aktiv frei. Sowohl Bax als auch Bak werden von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L) gebunden und so daran gehindert, Apoptose auszulösen. BH3-Proteine können wiederum

durch Bindung an die Bcl-2-Proteine die Hemmung von Bax und Bak aufheben und so zu Apoptose führen.

Neben der strukturellen Ähnlichkeit einiger Bcl-2-Proteine zu bakteriellen, porenbildenden Proteinen weist die Fähigkeit sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Familienmitglieder, Ionen-leitende Kanäle in synthetischen Lipidmembranen zu bilden (pro-apoptotische bei neutralem pH, anti-apoptotische bei acidem), auf einen eventuellen Funktionsmechanismus hin. Es wird davon ausgegangen, dass die pro-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2-Familie selbst dazu fähig sind, ionendurchlässige Kanäle durch die äussere Mitochondrienmembran zu bilden, die dann zum osmotisch bedingten Anschwellen des Mitochondriums, konsekutiv zur Permeabilisierung und damit zum Austreten der Apoptose-auslösenden Faktoren aus dem Intermembranraum führen. Auch könnte die Bildung von solchen Kanälen durch Interaktionen mit den anti-apoptotischen oder anderen, in der mitochondrialen Membran enthaltenen Proteinen (z.B. VDAC, engl. voltage-dependent anion channel) hervorgerufen werden [Shimizu et al., 2001]. Ein relatives Überwiegen der Aktivität von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern scheint das Überleben der individuellen Zelle zu gewährleisten [Korsmeyer et al., 1993].

Die Regulation der Bcl-2-Familienmitglieder erfolgt auf verschiedensten Ebenen. Z.B. wird Bax auf transkriptioneller Ebene durch den Tumorsuppressor P53 induziert (siehe Abschnitt 1.2.8; [Hussain and Harris, 2000]). Die Phosphorylierung von Bad durch die Proteinkinase B (PKB/Akt) und durch Proteinkinase A (PKA) hemmt die apoptotische Wirkung des BH3-Proteins [Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Harada et al., 1999].

Durch CD95L ausgelöste Caspase-8-Aktivierung führt zur Umsetzung von Bid zu tBid, welches direkt die Permeabilisierung der äusseren Mitochondrien-Membran herbeiführt [Crook et al., 1993; Lutter et al., 2001] - in manchen Zelltypen ist die im DISC produzierte Menge an aktivierter Caspase-8 nicht ausreichend für die Auslösung der Apoptose, wenn nicht die Amplifikation über die intrinsische Signalkaskade möglich ist (siehe Abschnitt 1.1.6.2).

Ob die Mitglieder der Bcl-2-Familie, abgesehen von ihrer wichtigen Rolle bei der intrinsischen Apoptose, noch andere physiologische Funktionen innehaben, ist bisher nicht vollständig geklärt. Zumindest für Bcl-2 und Bcl-x_L wurden aber noch andere, nicht mit dem Mitochondrium assoziierte anti-apoptotischen Funktionsweisen nachgewiesen [Fleury et al., 2002; Lamothe and Aggarwal, 2002].

1.1.6.2 Typ I- und Typ II-Zellen

In diesem Zusammenhang muss die wichtige Unterscheidung von Typ I- und Typ II-Zellen erläutert werden. Der Unterschied zwischen Typ I- und Typ II-Zellen besteht darin, dass CD95L-induzierte Apoptose bei Typ I-Zellen nicht durch eine Blockierung des mitochondrialen Signalwegs, z.B. durch Bcl-2-Überexpression, verhindert wird. Als Typ I-Zellen werden solche Zelltypen bezeichnet, die nach Behandlung mit CD95L in Apoptose übergehen, ohne dass dabei der mitochondriale Pathway aktiviert werden muss [Krammer, 2000].

Bei Typ II-Zellen hingegen ist nach CD95L-Inkubation eine Beteiligung des Mitochondriums bei der Apoptose essentiell. Werden bei Typ II-Zellen die Mitochondrien z.B. durch Bcl-2-Überexpression geschützt, so kann die Apoptose nicht eingeleitet werden [Boldin et al., 1995; Krammer, 1999].

1.1.7 Weitere Regulatoren der Apoptose

1.1.7.1 IAPs und IAP-Antagonisten

Die Mitglieder der IAP (engl. inhibitor of apoptosis proteins)-Proteinfamilie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer oder mehrerer sogenannter BIR-Domänen (engl. baculovirus inhibitor of apoptosis repeats) aus. Das erste Mitglied dieser Familie wurde im Baculovirus entdeckt [Crook et al., 1993]. Die BIR-Domäne bindet direkt an die aktiven Zentren von Caspasen und interferiert so mit deren katalytischen Aktivität. IAPs können also bereits aktivierte Caspasen inhibieren, und zwar je nach IAP sowohl Initiator- als auch Effektor-Caspasen. Es wurde auch gezeigt, dass bestimmte IAPs die Konjugation von aktivierten Caspasen und dem kleinen Protein Ubiquitin verursachen und damit deren Abbau herbeiführen (sog. Ubiquitinierung). Einige IAPs (Survivin, XIAP) werden in Tumoren überexprimiert gefunden und deshalb als potentielle Onkogene angesehen [LaCasse et al., 1998]. Abgesehen von ihrer anti-apoptotischen Wirkung scheinen IAPs auch regulatorische Funktionen bei anderen Prozessen, z.B. der Mitose, zu haben [Silke and Vaux, 2001; Yang and Li, 2000]. Mitglieder der IAP-Familie sind c-IAP-1, c-IAP-2, Survivin, XIAP, NIAP und Bruce. Sie werden zum Teil durch extrazelluläre Signale induziert [Vaux and Silke, 2003; Verhagen et al., 2001; Wang et al., 2003].

Das bereits erwähnte Smac/DIABLO, ein normalerweise im Intermembranraum lokalisiertes Protein, wird im Zuge der intrinsischen Apoptose wie Cytochrom c aus den Mitochondrien entlassen, bindet spezifisch an IAPs und hemmt damit ihre Bindung an die aktivierten

Caspasen [Hegde et al., 2002]. Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium führt zum Wegfall der IAP-vermittelten Caspase-Hemmung und bewirkt so eine Aktivierung.

Ein Protein mit ähnlicher Funktion wie Smac/DIABLO ist HtrA2/Omi (engl. **h**uman **h**igh **t**emperature **r**equirement **f**actor **A**2). Beide Proteine enthalten N-terminal ein konserviertes IAP-Bindungsmotiv (Aminosäuresequenz: AVPS), welches erst nach post-translationalem Import in das Mitochondrium durch Abspaltung der N-terminalen Präsequenz freigelegt wird [Hegde et al., 2002; van Gurp et al., 2003], jedoch hat HtrA2 als Serinprotease noch andere Funktionen.

1.1.7.2 AIF

Ein weiterer im Mitochondrium enthaltener Apoptose-Mediator ist AIF. Es handelt sich hierbei um ein stark konserviertes Flavoprotein, das nach Austritt aus dem Mitochondrium in den Zellkern wandert und dort zu Chromatin-Kondensation und Fragmentierung der DNA führt [Vaux and Silke, 2003]. AIF wird auch für Arten der Caspase-unabhängige Apoptose verantwortlich gemacht [Cande et al., 2002].

1.1.7.3 FLIP

FLIP (engl. **FL**ICE **i**nhibiting **p**rotein) ist ein Caspase-8-Homolog, das in zwei Isoformen vorkommt – FLIP_L(engl. long) und FLIP_S(engl. short), beide können am DISC binden [Scaffidi et al., 1999a]. Während FLIP_S weiterhin als Inhibitor der Caspase-Aktivierung angesehen wird, haben neue Forschungsergebnisse gezeigt, dass FLIP_L auch dazu fähig ist Caspase-8 zu aktivieren [Micheau et al., 2002].

1.1.8 Die Rolle der Apoptose in menschlichen Erkrankungen

Neben der entscheidenden Rolle bei der Entstehung und der Progression von Krebs (siehe Abschnitt 1.3), ist es inzwischen erwiesen, dass genetische Defekte in der Apoptose-Regulation direkt zu einer Reihe von Erkrankungen führen, bzw. negativen Einfluss auf den Verlauf einiger Krankheiten ausüben.

So ist bekannt, dass das Absterben eines Grossteil der bei Herzinfarkt und Schlaganfall untergehenden Zellen durch Apoptose verursacht ist. Es ist also ein exzessiver Überschuss an Apoptose, der hier die Erkrankung verstärkt [Bernecker et al., 2003; Martin-Villalba et al., 2001]. Im Gegensatz dazu können durch gehemmte Apoptose Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden, wie z.B. das sogenannte auto-immune lymphoproliferative Syndrom

(ALPS). Die bei dieser Erkrankung akkumulierenden T-Zellen führen zu Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie und Autoimmunität, die wahrscheinlich auf Defekte in der positiven Selektion im Thymus zurückzuführen ist [Sneller et al., 1992]. In über 80 % der Erkrankten lässt sich eine Mutation des Gens für den CD95-Rezeptor oder dem CD95-Liganden nachweisen [Rieux-Laucat et al., 1995]. Die Erkrankung geht mit einem erhöhten Risiko an malignen Lymphomen zu erkranken einher [Bleesing, 2003].

Ein Überschuss an Apoptose wird auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie beim Alzheimer- und Parkinson-Syndrom, als ursächlich angenommen [Ekshyyan and Aw, 2004; Tatton et al., 2003]. Das Verständnis der molekularen Zusammenhänge, die hinter diesen Erkrankungen stehen, bietet möglicherweise Ansätze für zukünftige Therapiestrategien.

1.2 Zellteilung und Zellzyklus

1.2.1 Geschichte und Morphologie des Zellzyklus

Der Vorgang, der die Neubildung von zwei neuen, genetisch identischen Zellen aus einer Mutterzelle umfasst und damit die Grundlage von biologischem Wachstum und Reproduktion darstellt, wird als Zellteilung bezeichnet. Die Gesamtheit der Vorgänge einschliesslich Wachstum, Replikation und Zellteilung, die zum Entstehen zweier Zellen aus einer Mutterzelle führen, wird als Zellzyklus bezeichnet.

Die molekularen Prozesse, die an der Zellteilung beteiligt sind, waren in den letzten Jahrzehnten Gegenstand intensiver Untersuchungen, die in einem für eukaryotische Zellen gültigen molekularen Modell des Zellzyklus' resultierten. Die Einführung dieses Modells wurde nicht zuletzt durch aufschlussreiche Studien von den Nobelpreisträgern für Medizin/Physiologie 2001 (Lee Hartwell, Timothy Hunt und Paul Nurse) ermöglicht, die mittels Mutationsanalysen zellzyklus-spezifische Schlüsselgene der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* identifizierten [Hunt, 1991; Minshull et al., 1989].

Mikroskopische Untersuchungen ermöglichten bereits Ende des 19. Jahrhunderts die Unterteilung des Lebenszyklus einer eukaryotischen Zelle in Interphase und Mitosephase, und eine weitere Untergliederung der Mitosephase in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase durch Eduard Strasburger (1844-1912) (siehe Abbildung 1.7).

Innerhalb des Zellzyklus' ist die Interphase die Phase der höchsten Stoffwechselaktivität. Es sind noch keine mikroskopisch sichtbaren, auf Zellteilung hindeutenden Merkmale vorhanden. In der Mitosephase kommt es zuerst zur Kernteilung und dann zur

Durchschnürung des Zelleibs und somit zum Entstehen zweier Tochterzellen. Die Interphase steht zwischen zwei Mitosen.

Charakteristisch für die Interphase, die bei den meisten Zellen circa 95% der gesamten Zellzyklusdauer ausmacht, ist die Zunahme an Volumen und Masse, die Replikation des Erbguts, welches in dieser Phase unkondensiert in Form von Chromatin vorliegt, und die Verdopplung des Centriolenpaares.

In der Prophase kondensiert das Erbgut der Zelle, indem es Chromosomen formt, und der sogenannten Spindelapparat wird gebildet, indem die Mikrotubuli, die das Cytoskelett formen, zerfallen und sich strahlenförmig um die beiden Centriolenpaare, die sich stetig voneinander entfernen und an entgegengesetzten Polen zu liegen kommen, reorganisieren. Weiterhin bildet sich an den Verbindungsstücken der sogenannten Schwesterchromatiden (dem Centromer), die zusammen ein Chromosomen ausmachen, ein als Kinetochor bezeichneter Proteinkomplex. Die Kondensation des Erbguts verursacht das Sistieren der Genaktivität und die Auflösung des Nukleolus. Definitionsgemäss endet die Prophase mit der beginnenden Auflösung der Kernmembran, die in der Prometaphase abgeschlossen ist. Die Auflösung der Kernmembran ermöglicht die Ausdehnung des Spindelapparates auf die Kinetochore, somit entstehen Verbindungen zwischen den Chromosomen und beiden Centriolenpaaren.

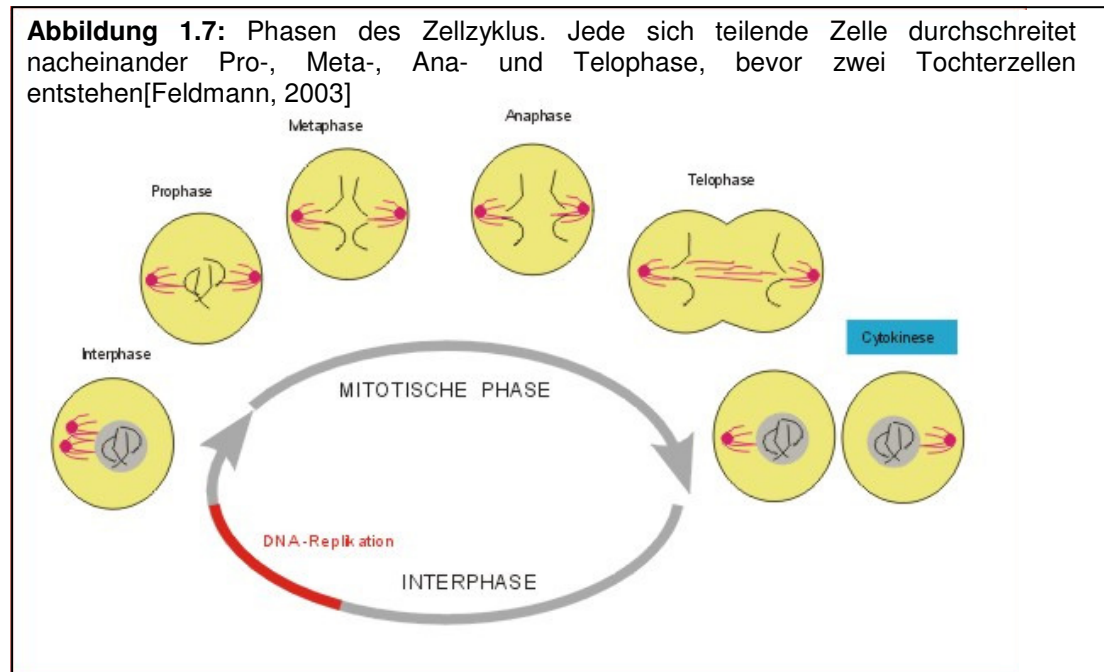
Da über diese Verbindungen starke Zugkräfte auf die Chromosomen ausgeübt werden, die mit der Entfernung zum jeweiligen Spindelpol grösser werden, bewegen sie sich auf einen zwischen beiden Spindelpolen liegenden Punkt zu.

Im nächsten Stadium, das als Metaphase bezeichnet wird, ist die Ansammlung der Chromosomen in der zwischen den beiden Spindelpolen liegenden Äquatorialebene (Zellteilungsebene) der Zelle abgeschlossen. Es bildet sich die sogenannte Äquatorialplatte. In diesem Stadium lässt sich die Mitose durch Spindelgifte arretieren – ein Umstand, der bei der Erstellung eines Karyogramms zur Anreicherung von Zellen in der Metaphase ausgenutzt wird.

Der nächste Abschnitt der Mitose, die Anaphase, beginnt mit der Trennung der beiden Schwesterchromatiden an den Centrosomen und der anschliessenden Bewegung je einer Schwesterchromatide zu jeweils einem Spindelpol. Gleichzeitig beginnt die Teilung des Cytoplasmas durch Einschnürung der Zellmembran an einem Actin und Myosin-enthaltenden kontraktilen Ring in der Äquatorialebene. Dieser Vorgang wird als Cytokinese bezeichnet und wird erst nach Abschluss der letzten Mitosephase - der Telophase - beendet.

In der Telophase kommt es auch zur Bildung neuer Kernmembranen um die an den beiden Polen angekommenen Chromosomen, die sich in der Folge wieder entspiralisieren.

Beide neu entstandenen Zellen befinden sich nach Abschluss der Mitose wieder in der Interphase (siehe Abbildung 1.7). Der Vorgang der Mitose dauert normalerweise etwa 30 Minuten.



1.2.2 Der Zellzyklus aus der molekularen Perspektive

Anhand des DNA-Gehalts kann die Interphase in G_1 - (gap, engl.: Lücke/Spalt; oder auch growth, engl.: Wachstum), S- (Synthese) und G_2 -Phase unterteilt werden, während man die restlichen Phasen zur M-Phase (Mitose) zusammenfassen kann. Zellen, die sich nicht weiter teilen, was bei ausdifferenzierten Zellen meist der Fall ist (z.B. Neuronen), werden als in der G_0 -Phase befindlich definiert. In der G_1 -Phase ist keine DNA-Synthese nachzuweisen (woraus die Bezeichnung resultiert (s.o.)) - die Replikation der DNA findet in der S-Phase statt und ist mit dem Eintritt in die G_2 -Phase, in der die Zelle für kurze Zeit vor dem Durchlaufen der eigentlichen Zellteilung verweilt, abgeschlossen.

Die Mitose ist für den Organismus ein notwendiger Vorgang, dessen Ablauf durch ein komplexes Kontrollsystem streng reguliert und kontrolliert wird. Dieses Kontroll- und Steuerungssystem sorgt dafür, dass die verschiedenen Teilschritte der Zellteilung nacheinander ablaufen, also z.B. die DNA-Synthese erst dann angefangen wird, wenn die Zelle eine ausreichende Größe und Nährstoffversorgung aufweist oder die Mitose erst eingeleitet wird, wenn das Erbgut vollständig repliziert wurde, und dafür, dass der Prozess

gestoppt werden kann, falls bestimmte Teilschritte fehlerhaft verlaufen sein sollten oder sich Störungen, wie DNA-Schäden, ergeben haben.

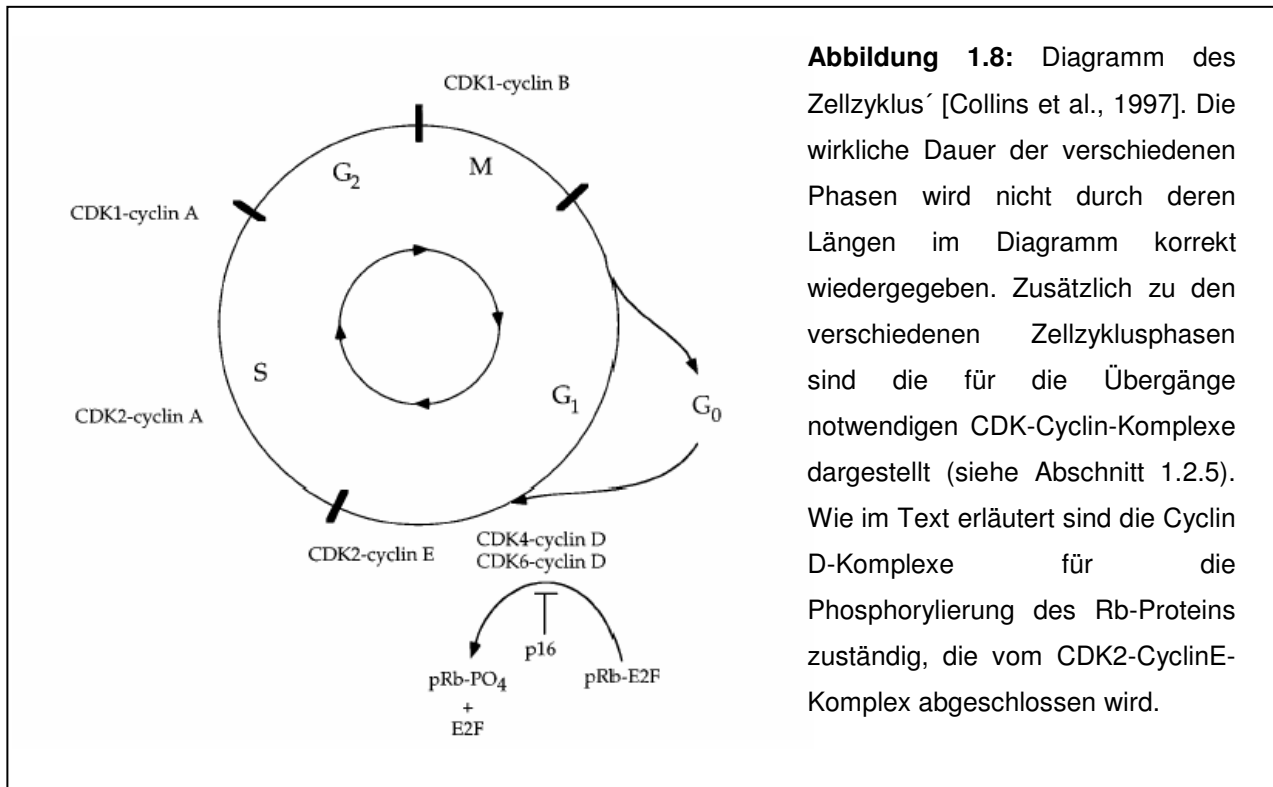


Abbildung 1.8: Diagramm des Zellzyklus [Collins et al., 1997]. Die wirkliche Dauer der verschiedenen Phasen wird nicht durch deren Längen im Diagramm korrekt wiedergegeben. Zusätzlich zu den verschiedenen Zellzyklusphasen sind die für die Übergänge notwendigen CDK-Cyclin-Komplexe dargestellt (siehe Abschnitt 1.2.5). Wie im Text erläutert sind die Cyclin D-Komplexe für die Phosphorylierung des Rb-Proteins zuständig, die vom CDK2-CyclinE-Komplex abgeschlossen wird.

1.2.3 Kontrolle der Zellteilung durch extrazelluläre Signale

Die Zellen multizellulärer Organismen benötigen, um zu überleben und sich teilen zu können, ein spezielles extrazelluläres Milieu, das durch deren Umgebung erzeugt wird.

Kontakte zur Matrix und zu Nachbarzellen sind dabei ebenso wichtig, wie Nährstoffe und lösliche Botenstoffe - Wachstums- oder Überlebensfaktoren (engl. „survival factors“) und Hormone. Hierbei kann zwischen lipophilen Hormonen, die durch die Plasmamembran der Zellen diffundieren und direkt an einen nukleären Transkriptionsfaktor binden (z.B. Thyroid-Hormon, Geschlechtshormone und Glukokortikoide), und hydrophilen Peptidhormonen, die an einen membranständigen Rezeptor binden, unterschieden werden [Parker, 1990; Pawson, 1993]. Während die Mitglieder der ersten Gruppe von spezialisierten Drüsenzellen über den Blutkreislauf verteilt werden und systemische Wirkungen auf den gesamten Organismus haben, wirken die Peptidhormone eher lokal (Ausnahmen sind hierbei z.B. Insulin, ACTH und Vasopressin, die auch zentral produziert werden und eine systemische Wirkung haben). Oft wird das Signal von Peptidhormonen durch Mitglieder der Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) vermittelt [Ruff-Jamison et al., 1993; Yarden and Ullrich, 1988]. Der

Ligandenbindung folgt bei dieser Klasse von Rezeptoren in der Regel die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, der dann eine Signalweiterleitung über verschiedene Adapter- und Signalproteine in Gang setzt. Unter diesen Signalproteinen gibt es einige Proteine, deren Gene als Protoonkogene aufgefallen sind. Dies sind z.B. ras, PI3-K und MAPK [Chakravarti et al., 2002]. Die onkogene Deregulation kann auf verschiedenen Ebenen dieser Signalkaskaden geschehen. Z.B. ergibt sich durch konstitutive Aktivierung mancher Kinasen ein ständiges mitogenes Signal, ohne dass Wachstumsfaktoren von außen an die Zelle herantreten. Auch produzieren manche Tumorzellen eigenständig Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, VEGF etc. - [Leu et al., 2003; Pouliot and Burgess, 2000; Pouliot et al., 2000]), mit der Folge, dass sie sich selbst unablässig in autokriner Weise zu Zellteilung stimulieren und gleichzeitig der Zelluntergang verhindert wird [Venkateswarlu et al., 2002].

1.2.3.1 Integrine und Cadherine

Zellen können über Transmembranproteine einerseits Kontakt zu anderen Zellen, andererseits zu extrazellulärer Matrix aufnehmen. Für diese Interaktionen sind hauptsächlich Proteine aus der Integrin- und der Cadherin-Familie verantwortlich. Neben diesen gibt es noch eine Vielzahl anderer Adhäsionsmolekül-Familien, z.B. Selektine, Mucine, Connexine sowie Immunglobulin-artige Adhäsionsmolekül, die sich alle durch eine grosse Zahl an Mitglieder mit spezifischen Funktionen auszeichnen. Hier soll nur stellvertretend auf Integrine und Cadherine als die wichtigsten Vertreter der Adhäsionsmoleküle eingegangen werden. Beide können Signalkaskaden mit verschiedensten Konsequenzen für die Zellen auslösen.

1.2.3.1.1 Integrine

Integrine vermitteln hauptsächlich die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix (engl. **extracellular matrix**; ECM), vor allem Laminin, Fibronectin und Kollagen. Es sind Heterodimere, die sich aus einer α -(16 verschiedene Varianten bekannt) und einer β -(8 verschiedene Varianten bekannt) Untereinheit zusammensetzen. Sie bilden Hemidesmosomen und fokale Adhäsionen. Auf intrazellulärer Seite interagieren Integrine mit einer Vielzahl von Adapterproteinen (z.B. Paxillin, Talin und Vinculin) und mit dem das Zytoskelett ausmachenden Actin [Stupack and Cheresch, 2002]. Die Bindung der entsprechenden Liganden führt zu Beeinflussung der Adhäsion, der Mobilität und der Genexpression. Die Bindungsfähigkeit der Integrine kann auch von der Zelle reguliert werden, z.B. ist das Hauptintegrin von Thrombozyten GPIIb/IIIa unter normalen Bedingungen inaktiv. Kommt es allerdings zur Aktivierung der Thrombozyten, so führt es zu stabilen Bindungen an

Fibrinogen, von Willebrand-Faktor und Fibronectin. Dieser Effekt hat grosse Relevanz bei der Blutstillung [Fornaro et al., 2003].

Über die Regulation von bestimmten Kinasen, wie z.B. ILK (engl. **i**ntegrin-**l**inked **k**inase [Wu and Dedhar, 2001]) oder FAK (engl. **f**ocal **a**dhesion **k**inase [Schlaepfer et al., 1999]), können durch Bindung an ECM-Proteine verschiedene Signalwege in der Zelle ausgelöst werden, unter anderem der PI3K/Akt- Signalweg, der stark anti-apoptotisch ist, und der ERK/JNK-Signalweg, der zu erhöhter Proliferation unter anderem durch Cyclin D1-Hochregulation führen kann [Lee and Juliano, 2004].

Normale Zellen sind auf die Signale, die durch Integrine gegeben werden, angewiesen, um überleben und sich teilen zu können. Mutationen in Genen, die für die Integrine kodieren oder bei der Regulation von Integrinen beteiligt sind, können es Krebszellen erlauben, auch in unnatürlicher Umgebung zu überleben und zu proliferieren - dies könnte auch eine Voraussetzung für Metastasierung sein [Berry et al., 2004].

1.2.3.1.2 Cadherine

Die Familie der Cadherine umfasst etwa 40 verschiedene Mitglieder, die vor allem homophile Interaktionen eingehen, das heisst, dass sie die Bindung an Cadherine vom gleichen Typ bevorzugen. Dies hat anscheinend bei der Entwicklung von Organen eine grosse Bedeutung [Takeichi, 1994]. Die Expression von Cadherinen ist sehr Organ- bzw. Gewebs-spezifisch. Der cytosolische Teil dieser Glykoproteine interagiert über die Adaptermoleküle (Catenine) mit dem Cytoskelett und bildet dabei Desmosomen, die den Zusammenhalt von Epithelzellen gewährleisten [Wheelock and Johnson, 2003].

Cadherine werden auch für die Kontakthemmung (Kontaktinhibition) verantwortlich gemacht, die bei konfluent wachsenden Epithelien beobachtet werden kann. Krebszellen haben meist die Fähigkeit zur Kontakthemmung verloren, wodurch eine unkontrollierte Proliferation im Gewebekontext erst ermöglicht wird.

Der in Abschnitt 1.2.6.2 beschriebene CDK-Inhibitor p27 wird als der Mediator der Kontaktinhibition angesehen [St Croix et al., 1998]. Alterationen von Cadherin-Genen haben anscheinend auch eine Bedeutung bei Metastasierung [Chen et al., 2003].

1.2.4 Myc und seine Partner

Das *myc*-Gen wurde zuerst als virales Onkogen (*v-myc*) des Hühnervirus MC29, das in Hühnern zu einer als Myelocytomatose bezeichneten Krankheit führt, durch Sheiness et. al im Jahre 1979 beschrieben [Sheiness and Bishop, 1979]. Es folgte die Entdeckung von *c-myc*,

dem entsprechenden zellulären Onkogen [Vennstrom et al., 1982], und weiteren Mitgliedern der Myc-Familie, die zelltypspezifisch exprimiert werden und als Onkogene in verschiedenen Tumoren identifiziert wurden - *N-myc* und *L-myc* z.B. in Neuroblastomen, kleinzelligen Lungentumoren, Brust- und Ovarialkarzinomen [Nesbit et al., 1999]. Insgesamt ist das *myc*-Gen eines der am häufigsten bei Tumoren deregulierten Gene. Seine Überexpression führt zu erhöhter Proliferation, Zellwachstum und Inhibition der Differenzierung. Das onkogene Potential von *myc* ist gut untersucht [Adams et al., 1985], wobei besonders die Tatsache Interesse hervorruft, dass *myc* alleine überexprimiert Apoptose auslösen kann [Evan et al., 1992] und es einer weiteren Apoptose-hemmenden Läsion (wie z.B. konstitutive Ras-Aktivierung; [Richards et al., 1990]) bedarf, um eine manifeste Entartung hervorzurufen [Bazarov et al., 2001; Metz et al., 1995]. Das Genprodukt Myc ist ein Transkriptionsfaktor mit geringer Halbwertszeit, der die sogenannte E-Box – ein Promoterelement mit der Sequenz CACGTG – bindet und zur Transkription oder auch zu Reprimierung nachgeschalteter Gene führen kann. Dabei ist das Funktionieren von Myc von der Interaktion mit dem Protein Max (**Myc-associated protein X**) abhängig [Mao et al., 2003]. Eine Reihe weiterer Proteine (z.B. Mitglieder der Mad-Familie, Transkriptionsfaktoren wie Mnt oder Mga; [Baudino and Cleveland, 2001]) konkurrieren mit Myc um die Bindung an Max und scheinen so an der Regulation beteiligt zu sein.

Zu Zielgenen von Myc gehören Gene, die direkt an Replikationsvorgängen beteiligt sind, wie Ornithin Decarboxylase, Carbamyl-Phosphat Synthetase, Prothymosin, aber auch Zellzyklus-Regulationsgene, wie die Cyclin-Gene (siehe Abschnitt 1.2.5; [Daksis et al., 1994]). Es ist auch bekannt, dass Myc zum ubiquitinabhängigen Abbau von bestimmten Proteinen beitragen kann - darunter fallen u.a. auch CDK-Inhibitoren, die hemmend auf den Fortschritt im Zellzyklus wirken [Muller et al., 1997].

Es liegt nahe, Myc als einen zentralen Regulator im molekularen System von eukaryotischen Zellen anzusehen, der die Funktion hat, mitogene Signale mit dem Zellzyklus zu verbinden.

1.2.5 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs: engl. **cyclin-dependent kinases**) bilden eine Gruppe von relativ kleinen (35-40 kDa) Proteinkinasen von ähnlicher Struktur, deren Aktivität für das Einsetzen bestimmter Zellzyklusphasen direkt verantwortlich ist. Für ihre Aktivierung ist die Interaktion mit einem Mitglied einer Gruppe von regulatorischen Proteinen, den Cyclinen, notwendig [Ohtsubo et al., 1995; Tsai et al., 1993; Wittenberg et al., 1990]. Die CDKs können hierbei als katalytische, die Cycline als regulatorische Untereinheit eines Proteinkomplexes

angesehen werden. Zusätzlich wird die Aktivität der CDKs über Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch andere Kinasen und Phosphatasen (z.B. CDK-aktivierende Kinase, CAK; cdc25a) sowie durch Interaktionen mit CDK-Inhibitoren (CDIs; z.B. p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}) reguliert [Nagahara et al., 1999; Ravitz and Wenner, 1997]. Insgesamt sind beim Menschen neun CDKs bekannt, von denen mindestens vier an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (CDK1 bis CDK4). Die Expression der CDKs verläuft im Gegensatz zu ihrer Aktivität weitgehend zellzyklusunabhängig.

Die Expression und der Abbau von spezifischen Cyclinen bestimmen die Aktivierung der CDKs - sie spiegeln die Bereitschaft der Zelle wider, im Zellzyklus voranzuschreiten und dabei bestimmte Restriktionspunkte (engl. „check points“) zu passieren. Die drei wichtigsten Restriktionspunkte sind der G₁-Restriktionspunkt, der G₂-Restriktionspunkt und der M-Phase-Restriktionspunkt [Nasmyth, 1996; O'Connor and Fan, 1996]. Die Restriktionspunkte reagieren auf unterschiedliche Arten der Störung. Während der G₁- und der G₂-Restriktionspunkt nach DNA-Schäden aktiv werden, wird der M-Phase-Restriktionspunkt durch Schädigungen des Spindelapparates und der Kinetochoren aktiviert [Millband et al., 2002].

Der Übergang von der G₁- zur S-Phase wird in erster Linie dadurch gewährleistet, dass das sogenannte Rb-Protein (Genprodukt des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens, siehe Abschnitt 1.2.7) zuerst von dem CDK4/CyclinD-Komplex phosphoryliert wird und konsekutiv bestimmte Transkriptionsfaktoren aus seiner hemmenden Bindung entlässt (siehe Abschnitt 1.2.7.1) - interessanterweise sind die Komplexe aus Rb und manchen Transkriptionsfaktoren auch Inhibitoren der Transkription, sodass durch die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren auch eine Hemmung der Transkription aufgehoben wird.

Diese Transkriptionsfaktoren führen zur Expression der für den Übergang von der G₁- zur S-Phase notwendigen Proteine, z.B. Proteine, die direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind (wie z.B. Dihydrofolat-Reduktase, DNA-Polymerase α , Thymidin-Kinase, Cdc6, ORC1, MCMs u.a.) aber auch Cycline, wie Cyclin A und Cyclin E, das in der Folge mit CDK4 komplexiert. CDK4/Cyclin E vervollständigt die Phosphorylierung von Rb und initiiert damit die Replikation. Während der S-Phase ist zuerst der CDK2/CyclinA-Komplex, dann der CDK1/CyclinA-Komplex, der zur Beendigung der S-Phase benötigt wird, aktiv. Die Abfolge der verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexe während des Zellzyklus ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

1.2.6 CDK-Inhibitoren der INK4- und Cip/Kip-Familie

Die Inhibitoren der CDK/Cyclin-Komplexe (engl. CDK inhibitors = CDI) werden zwei Familien zugeordnet. Dies sind die INK4 (engl. **i**nhibitors of CDK**4**)- und die Cip/Kip (engl. CDK inhibitory **p**rotein/**k**inase **i**nhibitory **p**rotein)-Familie.

1.2.6.1 INK4-Familie

Den Mitglieder dieser Familie ist ein entwicklungsgeschichtlicher Ursprung und das Vorhandensein von vier Ankyrin-Wiederholungen in der Proteinstruktur gemeinsam, sowie ihre Fähigkeit, CDK-Aktivität zu hemmen [Roussel, 1999].

Die Proteine vermitteln ihre CDK-inhibitorische Funktion durch Bindung an CDK4 und CDK6, was die Interaktion mit den zugehörigen Cyclinen erschwert und damit ihre Aktivierung verhindert bzw. sie beendet. Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass sie dazu fähig sind, D-Cycline zu binden und so die Bindung mit den zugehörigen CDKs zu verhindern. Bei diesen inhibitorischen Funktionen ist das Vorhandensein eines funktionellen Rb-Proteins in der Zelle essentiell [Hirai et al., 1995].

Die INK-Familie wird Zellzyklusphasen-abhängig exprimiert mit einem Maximum während der S-Phase.

Bisher sind vier Mitglieder dieser Gruppe bekannt: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} [Chan et al., 1995; Guan et al., 1994]. p15 und p16 sind häufig in menschlichen Tumoren deletiert und kommen daher als Tumorsuppressor-Gene in Frage [Hirama and Koeffler, 1995].

1.2.6.2 Cip/Kip-Familie

Die Mitglieder der Cip/Kip-Familie (bekannt sind p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) binden prä-aktivierte CDK/Cyclin-Komplexe verschiedenster Zusammensetzung (Cycline A, E, D1-D3) und inaktivieren sie, indem sie durch die Bindung Konformationsänderungen in der katalytischen Region hervorrufen [Lee et al., 1995; Toyoshima and Hunter, 1994; Xiong et al., 1993]. p21 ist ein direkter Effektor des P53-Tumorsuppressors (siehe Abschnitt 1.2.8). Die Induktion des p21^{Cip1}-Gens folgt auf zellulären Stress aufgrund von ionisierenden Strahlen oder bestimmten Chemotherapeutika und führt zu Zellzyklusarrest oder Apoptose. Dies wird durch Bindung einerseits an CDKs und andererseits an das sogenannten PCNA (engl. **p**roliferating cell **n**uclear **a**ntigen) erreicht [Cayrol et al., 1998]. p21^{Cip1} ist dazu fähig,

Apoptose auszulösen [Wu et al., 2002], jedoch sind auch anti-apoptotische Effekte beschrieben worden [Cossarizza et al., 1993].

p27 wurde als Mediator von Kontaktinhibition schon erwähnt (siehe Abschnitt 1.2.4), es wurde aber nicht nur bei Kontaktinhibition in erhöhten Konzentrationen gefunden, sondern auch z.B. in TGF- β behandelten und anderen, in G₁-arrestierten (d.h. in ruhenden Zellen) [Polyak et al., 1994].

p27-Überexpression löst zuverlässig bei den meisten Zellen einen G₁-Arrest aus, während der Knock-Down mittels RNAi zu einer Hemmung des durch Mitogen-Depletion ausgelösten Zellzyklusarrests führt. Diese Aufhebung des Zellzyklus-Arrests führt zu Proliferation und zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Zellzyklus-abhängiger Chemotherapie - es hat also unter manchen Umständen anti-apoptotische Funktion [Drexler and Pebler, 2003; St Croix et al., 1996]. p27-Überexpression wird bei *in vivo*-Studien jedoch überwiegend als pro-apoptotisch beschrieben [Katayose et al., 1997; Supriatno et al., 2002], ebenfalls ist p27-Herabregulation in den meisten untersuchten Tumorarten ein Indikator für eine schlechte Prognose [Fredersdorf et al., 1997; Loda et al., 1997] - von dieser Regel ausgenommen sind u.a. endokrine Tumoren wie das kleinzellige Bronchialkarzinom [Lloyd et al., 1997]. Bei vielen metastatischen Colonkarzinomen wurde eine verminderte Menge an p27 in den Metastasen-Zellen beobachtet [Thomas et al., 1998].

Die Regulation von p27 erfolgt grösstenteils auf Proteinebene und zwar u.a. durch Ubiquitin-vermittelten Abbau nach bestimmten Phosphorylierungsschritten (p27 wird auch durch bestimmte CDKs phosphoryliert). Der Grad der Phosphorylierung korreliert umgekehrt mit der vorhandenen Proteinmenge [Lloyd et al., 1999].

1.2.7 Das Retinoblastom-Protein und die E2F-Familie

Das nukleäre Retinoblastom-Protein wird aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten in den Pocket-Regionen (engl. pocket = Tasche) zusammen mit zwei anderen Proteinen (p130 und p107) in die Gruppe der Pocket-Proteine eingeordnet. Das Phosphoprotein mit einer Molekülmasse von 105kDa besitzt mindestens drei Bindungsdomänen [Knudsen and Wang, 1996; Lees et al., 1991; Mihara et al., 1989]: Eine grosse, die Proteine aus der E2F-Familie aufnimmt, und zwei kleine, wovon die eine kleine Proteine bindet, die eine LXCXE-Peptidsequenz haben, während die andere die Tyrosinkinase c-Abl bindet. Zu den Proteinen, die eine LXCXE-Peptidsequenz aufweisen, gehören neben einigen zellulären Proteinen, wie Histon-Deacetylase (HDAC) und Cyclin D1, auch virale Onkoproteine, wie das E1A-Protein (Adenovirus), das LTA (engl. large tumor antigen - SV40) und das E7-Protein des humanen

Papillomvirus. Das Rb-Protein hat mindestens 16 potentielle CDK-Phosphorylierungs-Stellen, von denen 7 nachgewiesenermaßen zellzyklusabhängig phosphoryliert werden (Ser-249, -807, -811 und Thr-252, -373, -821, -826; [Mihara et al., 1989; Mittnacht, 1998].

Das auf dem Chromosom 13 liegende *Rb*-Gen stellt den Prototyp eines Tumorsuppressorgens dar und ist in ca. einem Drittel aller untersuchten Tumoren mutiert [Knudsen and Wang, 1996].

Eine somatische Mutation eines Allels stellt eine Prädisposition für eine Vielzahl von Krebsarten (vor allem Knochen- und Weichteil-Sarkome) dar, von denen das Retinoblastom - der häufigste, bei Kindern auftretende intraokuläre Tumor mit einer Häufigkeit von 1 auf 20.000 Lebendgeborene - namensgebend für das Gen war, welches 1986 durch Robert A. Weinberg isoliert wurde [Dryja et al., 1986].

1.2.7.1 Die E2F-Familie

Die Familie der E2F-Proteine (engl. **E2** recognition site transcription factor) beinhaltet mindestens sechs Mitglieder (E2F-1 bis E2F-6), die anhand von strukturellen Ähnlichkeiten in drei Subfamilien unterteilt werden können. Neben der strukturellen ist eine funktionelle Ähnlichkeit innerhalb der Subfamilien gezeigt worden [Dyson, 1998]. Zusätzliche Komplexität erwächst aus der Tatsache, dass die E2F-Proteine der Interaktion mit Mitgliedern der DP-Familie (engl. E2F **d**imerization **p**artner), von denen bisher zwei identifiziert worden sind, bedürfen, um transkriptionell aktiv zu sein [Stevens and La Thangue, 2003].

Neben einer CyclinA/CDK-Bindungsstelle weisen E2F-1, -2 und -3, die zusammen die erste Subfamilie bilden, ein nukleäres Importsignal (engl. **n**uclear **l**ocalisation **s**ignal, NLS) auf, das den Transport in den Zellkern bewirkt [Gaubatz et al., 2001]. Sie führen in aktivem Zustand zu zellulärer Proliferation. Künstliche Überexpression eines dieser Proteine führt dazu, dass Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, wieder in den Zellzyklus eintreten - auch entgegen dem arretierenden Einfluss von CDIs [Johnson et al., 1993]. Umgekehrt verhindern dominant-negative Mutationen den Eintritt in die S-Phase [Wu et al., 1996].

Die zweite Subfamilie der E2F-Familie schliesst E2F-4 und E2F-5 ein, die beide im Gegensatz zu den Mitgliedern der ersten Subfamilie kein nukleäres Importsignal und keine Bindungsstelle für CyclinA/CDK-Komplexe, jedoch eine Transaktivierungsdomäne, wie E2F-1 bis -3, besitzen. Um einen Import in den Nukleus zu erreichen, sind sie auf Komplexbildung mit DP-2, welches im Gegensatz zu DP-1 ein NLS besitzt, angewiesen. Weiterhin binden E2F-4 und E2F-5 vornehmlich nicht an das Rb-Protein, sondern an p107 und p130. E2F-4 und E2F-5 sind sowohl an Transkription als auch an Repression beteiligt.

E2F-6, das alleine die dritte Subfamilie ausmacht, besitzt keine Cyclin/CDK-Bindungsstelle, kein NLS und auch keine Transaktivator-Domäne. Es besitzt einen inhibierenden Einfluss auf die Transkription von E2F-Zielgenen.

Bisher konnten in Hinblick auf die Bindung von E2F-spezifischen Zielgenen (engl. E2F-responsive elements) keine Unterschiede zwischen den Subfamilien nachgewiesen werden.

Neben den bei der Replikation benötigten Genen werden auch solche transkribiert, die an Apoptose beteiligt sind (z.B. Apaf-1, dessen Expression anscheinend auch ohne Verlust des MMP Apoptose herbeiführen kann; [Furukawa et al., 2002]) und die zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose führen können, z.B. *p14^{ARF}* (engl. **alternate reading frame**), das zur Induktion des Tumorsuppressors P53 (siehe Abschnitt 1.2.8.) führt.

1.2.8 P53 und seine Effektoren

1.2.8.1 P53

Ein weiteres wichtiges und bekanntes Tumorsuppressor-Gen ist das *p53*-Gen, dessen Genprodukt, das P53-Protein, eine zentrale Stellung bei der Kontrolle von Zellproliferation, Apoptose und DNA-Reparatur durch seine transkriptionelle Aktivität einnimmt. *p53* ist auf dem Chromosom 17 ansässig und setzt sich aus 11 Exons zusammen [Imamura et al., 2001]. Sequenzvergleiche von *p53* verschiedener Spezies ergaben 5 Blöcke evolutionär stark konservierter Regionen. Diese Regionen stimmen mit denen überein, die in Tumoren sehr häufig mutiert sind und DNA-Interaktionsstellen enthalten [Cho et al., 1994; Hollstein et al., 1994]. Dass *p53* das Gen mit der höchsten Mutationsrate in humanen Tumoren ist, impliziert seine Wichtigkeit in der Vermeidung von malignen Entartungen [Harris and Hollstein, 1993]. Wie auch beim Retinoblastom-Gen sind bei *p53* familiäre Mutationen bekannt, die mit einer Prädisposition für maligne Erkrankungen, u.a. Mamma- und Nebennierenkarzinomen, Sarkomen und Leukämien, einhergeht (Li-Fraumeni-Syndrom; [Olivier et al., 2003]).

Das *p53*-Genprodukt ist ein nukleäres Phosphoprotein, das vier strukturelle Domänen enthält: Eine N-terminale Transaktivatordomäne, eine DNA-Bindungsdomäne, eine Tetramerisierungs-Domäne und eine C-terminale Regulationsdomäne. Es zeigt unter normalen Bedingungen einen raschen Umsatz und eine gleichbleibende Konzentration in der Zelle, d.h. Synthese und Abbau liegen im Gleichgewicht. Obwohl die hochkomplexe Regulation von P53 noch nicht vollständig verstanden ist, geht man heute davon aus, dass der nach Ubiquitinierung stattfindende Abbau durch das 26S-Proteasom als Reaktion auf Stressreize wie bestimmte Chemotherapeutika, Depletion von Ribonukleotidtriphosphaten

und DNA-Schäden, aber auch auf die Aktivierung von Onkogenen (z.B. E2F und c-Myc) durch verschiedene, von der Art des Stressreizes abhängige Modifikationen gehemmt werden kann. Dabei werden mindestens zwei unterschiedliche Signalwege beschritten.

Beim Auftreten von DNA-Schäden wird durch Kinasen, wie z.B. DNA-PK (DNA-aktivierte **Proteinkinase**) oder ATM (engl. **a**taxia **t**elangiectasia **m**utated) P53 phosphoryliert und damit stabilisiert. Bei verstärkter Expression von Onkogenen kommt es zu vermehrter Transkription des Tumorsuppressors *p14^{ARF}*, dessen Genprodukt durch Hemmung des MDM2-Proteins zur Anreicherung von P53 führt. MDM2 ist eine Ubiquitin-Ligase, die den Abbau von P53 im Proteasom initiiert. Es wird von P53 induziert und reguliert so P53 im Sinne einer negativen Rückkopplung [Evan and Vousden, 2001].

Kurze DNA-Stücke, wie sie bei DNA-Schäden entstehen, können direkt zur Stabilisierung von P53 führen [Carl W., 2002]. Durch die Erhöhung der nukleären P53-Konzentration kann es seiner Funktion als tetramerer Transkriptionsfaktor in verstärktem Maße nachkommen und führt so zur positiven oder negativen Regulation von mehr als 150 Genen [Zhao et al., 2000] mit teils sehr unterschiedlichen Funktionen. Primäre Folge ist ein Zellzyklusarrest, der es der Zelle ermöglicht DNA-Reparaturen durchzuführen. Bei persistierender oder quantitativ stärkerer Erhöhung der P53-Konzentration wird dann Apoptose eingeleitet. Die genauen, vielfältigen Regulationsmechanismen, denen P53 unterliegt, sind allerdings noch nicht bekannt. So unterscheidet sich der funktionelle Einfluss von P53 von einer Zellart zur anderen in grossem Maße. Beispielsweise führt eine durch Bestrahlung erhöhte P53-Konzentrationen in Lymphozyten schneller zur Apoptose als in mesenchymalen Zellen, wie z.B. des Herzmuskels, ausserdem scheinen noch andere Faktoren, wie die Zellzyklusphase, eine Rolle zu spielen [Heinrichs and Deppert, 2003]. Die verschiedenen Zielgene von P53 deuten auf die funktionellen Mechanismen, durch die es seine Wirkung entfaltet, hin.

Die verstärkte Transkription des *p21^{Cip1}*-Gens durch P53 führt, wie in Abschnitt 1.2.6.2 schon besprochen, zu Zellzyklusarrest in der G₁- und G₂-Phase und unter Umständen zu Apoptose [Cayrol et al., 1998; Wu et al., 2002]. Einen entsprechenden Effekt erbringt die Induktion von GADD45 (engl. **g**rowth **a**rrest and **D**N-A-**d**amage) durch P53. Dieser Zellzyklusarrest kann temporär sein, wenn DNA-Reparaturmechanismen, wie das Basenexzisionsreparatur-System (engl. **n**ucleotide **e**xcision **r**epair, NER), den auslösenden Schaden beheben können und damit das P53-induzierende Signal wieder abschalten, kann aber auch in einen terminalen Zellzyklus-Block (Seneszenz) oder in programmierten Zelltod übergehen [Campisi, 2001; Sugrue et al., 1997]. Die Apoptose-induzierenden Effektoren von P53 sind u.a. Bax, Apaf-1 und PUMA (engl. **p**53 **u**pregulated **m**odulator of **a**poptosis), wobei auch von *p21^{Cip1}* neben

der arretierenden eine apoptotische Wirkung ausgehen kann [Wu et al., 2002]. Über das spezifische Verhalten von P53 entscheiden auch post-translationelle Modifikationen, wie Phosphorylierungen, denen das Protein unterworfen ist [Xu, 2003].

1.3 Proliferation, Apoptose und Krebs

Krebs ist die Bezeichnung für eine grosse Gruppe von Erkrankungen, die durch ein überschüssiges, unkontrolliertes Zellwachstum und Entdifferenzierung charakterisiert sind. Die Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Krebsentstehung und -progression haben zu der Schlussfolgerung geführt, dass maligne Entartung auf ineinandergreifenden Defekten in den beiden Zellfunktionen Proliferation und Apoptose beruht [Evan and Vousden, 2001; Green and Evan, 2002; Mendelsohn et al., 2002]. Viele genetische Läsionen, die eine erhöhte Proliferation bewirken, wie z.B. Myc-Überexpression, führen auch zu einer erniedrigten Toleranz gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli, so dass erst ein zweites, unabhängiges Ereignis, welches die Apoptose-Funktion stört, zu der endgültigen Manifestation eines Malignoms führt. Einige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass umgekehrt anti-apoptotische Mechanismen zu einer Einschränkung der Proliferation führen können [Greider et al., 2002; Quinn et al., 2003; Vairo et al., 2000; Zornig et al., 1998]. Verschiedene zelluläre Schutzmechanismen koppeln also die beiden kritischen Zellfunktionen Apoptose und Proliferation und verhindern so die Entwicklung einer Krebserkrankung aufgrund einer einzelnen Mutation. Das heißt, dass kombinierte genetische Veränderungen, die durch Karzinogene, aber auch genetische Prädispositionen begünstigt werden können, nötig sind, um zur Entartung einer einzelnen Zelle führen zu können [Hueber et al., 1998].

In einer grossen Anzahl von Publikationen sind molekulare Mechanismen der Kopplung von Apoptose und Proliferation gezeigt worden. Z.B. zeigten Mendelsohn et al., dass Cyclin D3 Caspase-2 direkt aktivieren kann [Mendelsohn et al., 2002]. Dies könnte die maligne Entartung bei Cyclin D3-überexprimierenden Zellen durch Apoptose-Induktion verhindern.

Durch Greider et al. wurde nachgewiesen, dass die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L (siehe Abschnitt 1.1.6.1) den Myc-induzierten Eintritt in den Zellzyklus durch Induktion von p27 inhibieren können [Greider et al., 2002] - ein Beispiel für anti-proliferative Effekte von anti-apoptotische Moleküle.

2 Zielsetzung

Die Zelldichte und ihr Effekt auf Proliferation und Apoptose:

Neben Invasion, Entdifferenzierung und Metastasierung kann auch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit zu den Charakteristika der Malignität einer Neoplasie gezählt werden. Bei Leukämien, Lymphomen und bestimmten soliden Tumoren, bei denen eine chirurgische Resektion ebenfalls nicht möglich ist, bedeutet jedoch ein langsames Wachstum, d.h. eine geringe Proliferation der Tumorzellen, in der Regel keine verbesserte Prognose, da sie mit schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung einhergeht.

Die molekularen Ursachen dieser Behandlungsresistenz sind bisher nicht vollständig geklärt und wahrscheinlich nicht bei allen Tumoren identisch.

Vorstellbar ist, dass sich das Gesamtsystem der Zelle während des Teilungsprozesses sensibler gegenüber Schädigungen der DNA, wie sie durch Bestrahlung und die meisten Chemotherapeutika ausgelöst werden, präsentiert [Böcker, 1997]. Dies kann durch verschiedene molekulare Mechanismen, wie sie in Abschnitt 1.3 besprochen wurden, verursacht sein.

Um den möglichen Einfluss des Proliferationsverhaltens einer Zellpopulation auf das Apoptose-Verhalten zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Proliferationsgeschwindigkeit einer Zellkultur mittels Dichte-Arretierung zu senken. Hierzu wurden RKO-Zellen in konfluenter und subkonfluenter Dichte kultiviert. Unterschiede bei der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen sollten ermittelt werden.

Durch Inkubation mit CD95L sollte dann ein eventueller Zusammenhang von Proliferation und Apoptosesensitivität ermittelt werden, d.h. die „Zellzyklusabhängigkeit“ der CD95L-induzierte Apoptose untersucht werden.

Verschiedene Methoden (z.B. Western-Blot-Analyse, FACS-Messungen) sollten zur Aufklärung der molekularen Ursachen genutzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL (Systec/Wettenberg, Deutschland)
Blotter: Semi Dry Transfer Unit TE70 Semiphor (Hoefer/San Francisco, USA)
Brutschränke und Inkubatoren: <ul style="list-style-type: none"> • IR Sensor, CO₂-Inkubator, (Sanyo/Wiesloch, Deutschland) • Brutschrank „Function Line“, 37° C, nicht begasbar, (Heraeus/Hanau, Deutschland)
Elektrophorese-Apparaturen: <ul style="list-style-type: none"> • DNA Minisubcell für Agarosegele (BioRad/Hercules, USA) • Gelkammer und -schlitten Modell HE 33-GNA 200 (Pharmacia/Freiburg, Deutschland) • Vertical-Minigelapparatur MV 120 für PAGE: 8,6 cm x 7,7 cm (Savant/New York, USA) • Gelständer: Vertical Slab Gel Unit SE400 (Hoefer/San Francisco, USA)
Filmkassette: Modell Hypercassette (Amersham/Buckinghamshire, GB)
Fluorometer: Fluostar Optima (Fa. BMG Labtechnologies/Offenburg)
Geltrockner Modell 483 (BioRad/Hercules, USA)
Heizblöcke: Thermomixer compact (Eppendorf/Hamburg, Deutschland) Dri-Block DB-3 (Techne/Dexford-Cambridge, GB)
Kühlschränke: <ul style="list-style-type: none"> • Gefrierschrank CFC Free (-80° C) (Sanyo/Wiesloch, Deutschland) • Kühlschrank (4° C) und Gefrierschrank (-20° C) (Liebherr/Ochsenhausen, Deutschland)
Magnetrührer: Modell IKA-Combimag RCH (IKA Labortechnik/Staufen, Deutschland)
Mikroskop: Axiovert 25 (Zeiss/Jena, Deutschland)
Mikrowelle: Privileg 7533P (Quelle/Fürth, Deutschland)
Netzteile: <ul style="list-style-type: none"> • Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham/Buckinghamshire, GB) • Power Pac 300 (BioRad/Hercules, USA)

Partikelzählgerät: Particle Counter Z1 (Beckman Coulter/Fullerton, USA)
pH-Meter: Modell PHM 83 autocal (Radiometer/Kopenhagen, Dänemark)
Photometer: SmartSpec (BioRad/Hercules, USA)
Pipetten: Mit max. Volumen: 2, 20, 200 und 1000 µl (Abimed/Düsseldorf, Deutschland)
Pipettierhilfen: Pipetus-akku (Hirschmann/Neckartenzlingen, Deutschland)
Saugpumpe: Laboport(N86) (KNF Neuberger/Freiburg, Deutschland)
Stickstofftank: Typ Chronos Biosafe (Messer-Griesheim/Düsseldorf, Deutschland)
Ultraschall-Desintegrator: Branson Sonifier 250 mit Microtip (Branson Inc./Danbury, CT, USA)
UV-Quarzküvetten 6030/40 (Zeiss/Jena, Deutschland)
UV-Schirm Modell Transluminator (UVP Inc./San Gabriel, USA)
Vortexer: Modell Reax Top (Heidolph/Schwabach, Deutschland)
Waagen: <ul style="list-style-type: none"> • Modell 1219MP(Satorius/Göttingen, Deutschland) • Modell H10T (Satorius/Göttingen, Deutschland)
Wasserbäder: <ul style="list-style-type: none"> • (Köttermann/Uetze, Deutschland) • (GFL/Burgwedel, Deutschland)
Zählkammer (Neubauer/Nürnberg, Deutschland)
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Tischzentrifugen Typ Biofuge pico (Heraeus/Hanau, Deutschland) • Kühlzentrifuge 2K15 (Sigma/Deisenhofen, Deutschland) • Kühlzentrifuge Modell Varifuge 3.2. RS (Heraeus/Hanau, Deutschland)
Zytometer (Fluorescence activated cell sorter): FACS-Calibur (Becton-Dickinson/Oxford, GB)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- und 96-well Platten (BectonDickinson/Oxford, GB)
Autoklavierband (3M/St.Paul, USA)
Immobilon-P Transfer-Membran (PVDF) (Millipore/Bedford, USA)

Chromatographie-Papier (Whatman/Maidstone, USA)
Gewebekulturflaschen , 50 und 250 ml (BectonDickinson/Oxford, GB)
Gewebekulturschalen , 94/16mm (Greiner/Alphen an deen Rijn, NL)
Parafilm (ANC Company/Greenwich, USA)
Pipetten , serologische (5, 10 und 25ml) (BectonDickinson/Oxford, GB)
Pipettenspitzen (Greiner/Alphen an deen Rijn, NL)
Pipettenspitzen mit Filter (Greiner/Alphen an deen Rijn, NL)
Plastikküvetten (Sarstedt/Nümbrecht, Deutschland)
Polypropylen(PP)-Röhrchen - 15 und 50ml (BectonDickinson/Oxford, GB)
Polystyren(PS)-Röhrchen - 5ml (BectonDickinson/Oxford, GB)
Sterilfilter (Millipore/Bedford, USA)

3.1.3 Chemikalien

α -D-(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma/Karlsruhe, Deutschland
Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)	AppliChem/Darmstadt, Deutschland
Agarose (Electrophoresis Grade)	GibcoBRL/Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck/Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % in H ₂ O	Sigma/Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka/Buchs, CH
BSA, bovines Serumalbumin, gereinigt	NewEnglandBiolabs/Beverly, USA
Coomassie Blue G-250	Merck/Darmstadt, Deutschland
Dest. Wasser (H ₂ O)	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
Diethyldicarbonat (DEPC)	AppliChem/Darmstadt, Deutschland
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Merck/Darmstadt, Deutschland
DNase I	Sigma/Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma/Steinheim, Deutschland
ECL-Lösung 1 + 2	Amersham/Buckinghamshire, GB
Essigsäure, p.a. (100 %)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, p.a. (> 99,8 %)	Roth/Karlsruhe, Deutschland

Ethidiumbromid	Roth/Karlsruhe, Deutschland
FasL, rekombinant, human	Alexis/Grünberg, Deutschland
Formaldehyd (37 %ig)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (> 99,7 %)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid)	Molecular Probes/Eugene, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	BioWhittaker/Vervier, Belgium
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roche/Mannheim, Deutschland
Methanol, p.a.	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	AppliChem/Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline)	BioChrom/Berlin, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Ponceau-Lösung	Fluka/Buchs, CH
Propidium-Iodid (PI)	Roche/Mannheim, Deutschland
Protein A-gekoppelte Agarose Beads	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Proteingewichtsstandard (Benchmark)	GibcoBRL/Karlsruhe, Deutschland
Protease-Inhibitor Mix (COMPLETE)	Roche/Mannheim, Deutschland
Phenol/Chloroform	Roth/Karlsruhe, Deutschland
RNase A	Roche/Mannheim, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, reinst (37%)	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth/Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	AppliChem/Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Fluka/Buchs, CH

Trypsin-Lösung (2,5 %; 10x)	Boehringer/Mannheim, Deutschland
Tween 20	Pharmacia/Freiburg, Deutschland
Zitronensäure	Roth/Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Verwendete Lösungen

- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,6 (Eingestellt mit HCl)
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Eingestellt mit HCl)
- 38 mM Natrium-Citrat, pH 7,5 (Eingestellt mit Essigsäure)

Alle Lösungen wurden steril filtriert.

Zell-Lyse-Puffer:

10 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl

unmittelbar vor der Benutzung werden hinzugefügt:

- 100 mM PMSF und
- 1 Tablette Protease-Inhibitor-Mix auf 10 ml Puffer

Cycloheximid-Stocklösung:

0,1 mg/ml in dest. Wasser

Trypsin-Lösung:

10x Trypsin-EDTA-Lösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt.

Strip-Puffer (für Immunoblots):

62,5mM Tris HCl pH 6,7

0,2% SDS

vor Benutzung wurden noch 1 % β -Mercaptoethanol zugefügt.

Blot-Puffer für Western-Blot mit PVDF-Membranen:

10% 10x Blot-Puffer

20% Methanol

in H₂O

Block-Puffer:

1% BSA

1% Milchpulver

0,25% Tween 20

6x RNA-Ladepuffer:

50% Glycerin

5% SDS

0,25% Bromophenolblau

in DEPC-Wasser

(steril filtriert)

Propidium-Iodid-Stammlösung: 2,5 mg/ml in H₂O

Propidium-Iodid-Färbelösung: Stammlösung wurde mit Na-Citrat-Lösung auf eine Konzentration von 2,5 µg/ml verdünnt.

JC-1-Stammlösung: 5mg wurden in 1 ml DMSO gelöst

JC-1-Färbelösung: Stammlösung wurde mit PBS auf eine Konzentration von 10µg/ml verdünnt.

DISC-IP-Lyse-Puffer:

30 mM Tris

150 mM NaCl,

10% Glycerol

1% Triton X-100

3.1.5 Antikörper

- β -Actin: Klon C11, goat-polyclonal (Santa Cruz/Heidelberg, Deutschland)
- Bcl-X_L: Klon 2H12, mouse-monoclonal (BD Pharmingen/Hamburg, Deutschland)
- Caspase-3: Klon H-277 (Santa Cruz/Heidelberg, Deutschland)
- Caspase-8: mouse-polyclonal (freundlicherweise überlassen von Dr. Reiner Jänicke, Universität Münster)
- CD95: Klon Apo 1-3, mouse-monoclonal (Alexis/Grünberg, Deutschland) und Klon 2R2, mouse-monoclonal (Alexis/Grünberg, Deutschland)
- FADD: Klon 1, mouse-monoclonal (BD Pharmingen/Hamburg, Deutschland)
- Flag: Klon M2 (Sigma-Aldrich/Deisenhofen, Deutschland)
- FLIP: Klon NF6, mouse-monoclonal (Alexis/Grünberg, Deutschland)
- P21: Klon F5, mouse-monoclonal (Santa Cruz/Heidelberg, Deutschland)
- P27: Klon F8, , mouse-monoclonal (Santa Cruz/Heidelberg, Deutschland)
- Anti-mouse-Zweit-Antikörper - Ziege (Amersham/Buckinghamshire, GB)
- Anti-goat-Zweit-Antikörper - Schaf (ZyMed/San Francisco, USA)

3.1.6 Benutzte Kits

- RNA-Isolationskit: RNeasy Minikit (Quiagen/Hilden, Deutschland)
- Fluorometric Protease Assay Kit (BioVision/Wertheim, Deutschland)
- ECL-Western-Blotting-Kit (Amersham/Buckinghamshire, GB)

Beim Fluorometric Protease Assay Kit wurden folgende spezifische Caspase-Substrate verwendet:

- Caspase-3-Substrat (AFC) (Alexis/Grünberg, Deutschland)
- Caspase-8-Substrat (Alexis/Grünberg, Deutschland)
- Caspase-9-Substrat (Alexis/Grünberg, Deutschland)

Die Substrate wurden nach Anleitung in einer Konzentration von 6,85mM in DMSO gelöst.

3.1.7 Zellkulturmaterialien

DMEM (BioWhittaker/Verviers, Belgium)

Fötale Kälberserum - Fetal bovine serum (GibcoBRL/Karlsruhe, Deutschland)

L-Glutamin (BioWhittaker/Verviers, Belgium)

Penicillin-Streptomycin-Mix (BioWhittaker/Verviers, Belgium)

Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL/Karlsruhe, Deutschland)

Für die Zellen wurde das DMEM-Medium folgendermaßen aufbereitet:

10% FCS

1% PEN-Strep

2% L-Glutamin

Gefriermedium:

90% FCS

10% DMSO

3.1.8 Gele und Laufpuffer:

SDS-PAGE

Ansatz für 14,5 % Acrylamid-Gel:

Trenngel:

14,5 ml 30% Acrylamid

7,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8

7,5 ml H₂O

300 µl 10% SDS

20 µl TEMED

200 µl 10 % APS

Sammelgel:

2,5 ml 30% Acrylamid

3,7 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8

8,5 ml H₂O

150 µl 10% SDS

10 µl TEMED

200 µl 10 % APS

1l SDS-Laufpuffer:

10x Stocklösung wurde 1:10 mit H₂O verdünnt.

Probenpuffer:

200 µl 10 % SDS

100 µl 0,5 M Tris HCl pH 6,8

100 µl H₂O

100 µl 85 % Glycerin

3 µl Bromphenolblau (1%)

3 µl β-Mercaptoethanol

Coomassie-Lösung:

0,025 % (w/v) Coomassie G-250

10% (v/v) Essigsäure

RNA-Gel

In 400 ml 0,5 x TBE-Puffer (angesetzt mit DEPC-Wasser) wurden 1 % Agarose durch Erwärmen in der Mikrowelle und Schwenken gelöst. Ethidiumbromid wurde in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugefügt.

3.1.9 Zelllinien

RKO: humane Kolorectal-Karzinom-Zelllinie (ATCC-Nr.: CRL-2577), freundlicherweise erhalten von Matthias Schmidt (Atlanta Pharma, Deutschland).

Es handelt sich bei der CD95L-induzierten Apoptose um Typ-II-Zellen. RKO-Zellen exprimieren das Wildtyp-p53-Protein.

3.1.10 verwendete Software

Excel, Microsoft

Word 2000, Microsoft

Powerpoint, Microsoft

Photoshop, Adobe

Acrobat 5.0, Adobe

CellQuestPro, BD

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

RKO-Zellkulturbedingungen:

Kulturschalen (94 mm x 16 mm):

Dichter Ansatz: 1×10^7 Zellen mit 10 ml Medium

Dünnere Ansatz: 1×10^6 Zellen mit 10 ml Medium

Bedingungen für 6-well-Platten:

Dichter Ansatz: 2×10^6 Zellen mit 3 ml Medium

Dünnere Ansatz: 2×10^5 Zellen mit 3 ml Medium

Nach der Aussaat wurden die Zellen für 24 h kultiviert, bevor sie mit rekombinantem CD95L behandelt wurden. Dieser wurde in Kombination mit anti-Flag-AK (als crosslinker) und CHX (als Sensitizer) zugegeben.

Die Endkonzentrationen im Medium betrugen:

CD95L: 10 ng/ml

Anti-Flag-AK: 1 µg/ml

Cycloheximid (CHX): 100 ng/ml

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Auftauen der Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in 1ml Aliquots mit einer Zellzahl von etwa 2×10^6 in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37° angetaut und in ein 15 ml Polypropylen(PP)-Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 5 ml frischen Mediums wurde bei 200 g für 5 min. bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, um das DMSO-haltige

Einfriermedium möglichst vollständig auszuwaschen, bevor das Zellpellet in 7ml frischen Mediums resuspendiert und in eine 10ml Zellkulturschale zur Kultivierung überführt wurde.

3.2.2.2 Passagieren der Zellen

Die adhärennten RKO-Zellen wuchsen in Petrischalen im Inkubator bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ durchschnittlich 48 h, bis sie eine Konfluenz von etwa 80 % erreichten, bevor sie weiter passagiert wurden.

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen.

Danach wurde 1 ml 1x Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und im 37°-Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von der Petrischale ablösten.

Die in der Trypsin-Lösung befindlichen Zellen wurden daraufhin in 6 ml frischen Mediums aufgenommen, wobei noch leicht anhaftende Zellen mit dem Medium abgespült wurden.

1ml dieser Zellsuspension wurde in einer neuen 10 ml Kulturschale mit 6 ml frischen Mediums versetzt.

3.2.2.3 Einfrieren der Zellen

Die Zellen von einer etwa 80 % konfluenten Zellkulturschale wurden wie beim Passagieren trypsiniert, in 6 ml frischem Medium aufgenommen, in ein 15 ml-Polypropylen-Röhrchen überführt, für 5 min. bei 200 g zentrifugiert und durch Absaugen vom Medium befreit. Das verbleibende Zellpellet wurde daraufhin in 1ml Einfrierpuffer resuspendiert und in ein 1 ml Kryogefäß überführt.

Dann wurden die Kryogefäße über nacht im –80° C Gefrierschrank eingefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff eingelagert wurden.

3.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration von Suspensionen wurden zwei Methoden angewandt, die sich im Zeitaufwand unterschieden und bei verschiedenen Anwendungen benutzt wurden. Der Coulter-Counter wurde bei Anwendungen verwendet, bei denen die Zellkonzentrationen möglichst schnell und genau bestimmt werden sollten, die Neubauer Zählkammer hingegen bei allen anderen Anwendungen.

3.2.2.4.1 Neubauer Zählkammer

Nach Ernten der Zellen in frischen Medium wurden 10 µl der Zellsuspension abpipettiert und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden vier aus jeweils 16 Quadraten bestehende Felder ausgezählt. Der Mittelwert der vier Felder wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert und als Konzentration der Zellsuspension in Zellen pro ml verwendet.

3.2.2.4.2 Coulter Counter

Der Coulter Counter ist mit einer Kapillare ausgestattet, durch die Zell-Suspensionen gesogen werden. Gleichzeitig kann eine Spannung angelegt werden. Durch in der Suspension befindliche Partikel oder Zellen werden minimale Änderungen der Leitfähigkeit hervorgerufen und detektiert und ermöglichen es so dem Coulter Counter die Zellzahl eines Volumens abzuleiten.

Nachdem das Gerät mit isotoner Lösung gut gespült worden war, wurden die Einstellungen vorgenommen - dies waren die Partikelgröße, die in dem Bereich von 20 bis 50 µm eingestellt wurde, und der Verdünnungsfaktor (1:50).

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben aus den Kulturschalen gewonnen.

Darauf wurden 200 µl der zu bestimmenden Zellsuspension 1:50 mit isotoner Lösung auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt und in das Gerät eingebracht.

Jede Suspension wurde zweimal gemessen und der Mittelwert aus beiden Messungen als die Zellkonzentration der Suspension angenommen.

Nach jedem Messvorgang wurde das Gerät gründlich gespült, bis es für die Spüllösung einen Wert von weniger als 20.000 Partikel pro ml anzeigte.

3.2.3 Herstellung von Proteinlysaten für SDS-PAGE

Die Zellen wurden für die nachfolgende SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine per Ultraschall und Detergenzien lysiert.

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von den Zellkulturschalen gelöst und samt des vorhandenen Mediums in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt, um im Medium schwimmende apoptotische Zellen nicht zu verlieren.

Es folgte Zentrifugation bei 500 g für 5 min. und Absaugen des Mediums. Der gewonnene Zelniederschlag wurde in 400 µl des Zell-Lyse-Puffers resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorff-Cup pipettiert.

Die Zellsuspension wurde dann dreimal für 10 s mit Pausen sonifiziert und, nachdem 5 µl für die Proteinbestimmung abgenommen wurden, bei –80° C eingefroren.

3.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den differenziellen Vergleich der Expression einzelner Proteine in verschiedenen Zellansätzen beurteilen zu können, müssen bei der Gelelektrophorese äquivalente Mengen an Gesamt-Protein aufgetragen werden. Dazu wurde der Proteingehalt der aus den verschiedenen Zellkulturen hergestellten Lysate photometrisch mit Hilfe von Bradford-Reagenz bestimmt.

Die Bradford-Reagenz bindet spezifisch an Peptidbindungen und verändert dabei ihre Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm, so dass die Menge an Peptidbindungen, stellvertretend für die Proteinmenge, photometrisch im Vergleich zu einer Standardreihe mit bekanntem Proteingehalt abgeschätzt werden kann.

3.2.4.1 Durchführung

Aus der Albumin-Stammlösung (BSA: **b**ovine **s**erum **a**lbumin) wurde eine Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen erstellt:

1.	10	mg/ml
2.	5	mg/ml
3.	2	mg/ml
4.	1	mg/ml
5.	0,5	mg/ml
6.	0,1	mg/ml

Von den verschiedenen Verdünnungen sowie von den zu bestimmenden Lysaten wurden jeweils 5 µl in ein Eppendorff Reaktionsgefäß pipettiert. Für den Null-Wert wurde ein mit 5 µl destilliertem Wasser gefülltes Reaktionsgefäß verwendet. Zu den 5 µl wurde dann jeweils 1 ml von der 1:5 mit dest. Wasser verdünnten Bradford-Stammlösung zugefügt. Die Lösungen wurden daraufhin durchmischt und die Absorption bei der Wellenlänge 595 nm vermessen.

Das Photometer gab die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben in mg/ml an, nachdem es mit dem Null-Wert und einer Proteinverdünnungsreihe geeicht worden war.

3.2.5 SDS-PAGE und Westernblot

Die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz SDS lagert sich in einem definierten Verhältnis (0,4 g SDS /g Protein) an Proteine an, denaturiert diese und maskiert ihre Eigenladung, wodurch ein definiertes Masse/Ladungs-Verhältnis entsteht.

Die Ladungen, die aus den verschiedenen Aminosäureresten resultieren, sind in Anbetracht des stark negativ geladenen SDS vernachlässigbar, so dass Proteine verschiedener Molekulargewichte im Polyacrylamidgel einem elektrischen Feld folgend eine zu ihrem Molekulargewicht proportionale Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung der Anode aufweisen und so aufgetrennt werden können.

Im nächsten Schritt können die im Gel befindlichen, nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf einer Polyvinyl-Membran immobilisiert und darauf fixiert werden. Diese Western-Blot-Membran bietet die Möglichkeit der Durchführung von Immunoblots, d.h. das semi-quantitative Sichtbarmachen von Proteinen mittels spezifischer Antikörper.

Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich mit der Laufstrecke der Banden des Markers, der sich aus angefärbten Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht zusammensetzt.

3.2.5.1 Herstellung der Gele und Aufbau der Elektrophoreseapparatur

Die Gelständer wurden nach Anleitung zusammengesetzt und auf Durchlässigkeit überprüft, indem H₂O eingefüllt wurde. Daraufhin wurde das Wasser abgeschüttet und eine Markierung ca. 1cm unterhalb des unteren Endes des eingesetzten Kammes vorgenommen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Kamm wieder entfernt und bis zu der Markierung die kurz vorher vorbereitete Trenngellösung eingefüllt und mit Ethanol (70%) bedeckt, um eine glatte Begrenzung des Trenngels zu gewährleisten.

Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und mit H₂O abgespült, bevor das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und der Kamm wieder eingesteckt wurde. Der Kamm wurde nach Erstarren des Sammelgels wieder entfernt.

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben vorbereitet.

3.2.5.2 Vorbereitung der Proben

Die für die SDS-PAGE vorgesehenen Proben wurden folgendermaßen aufbereitet:

Je nach Ansatz wurden 5 bis 25 µg Protein aufgetragen. Das der bestimmten Proteinmenge entsprechende Lysat-Volumen wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Probenpuffer (Lämmli-Puffer, Rezept s.o.) vermischt und im Heizblock für 5 min auf 95° C erhitzt. Nach kurzem Herunterzentrifugieren wurden die verschiedenen Proben für wenige Sekunden auf Eis gestellt. Das polymerisierte Gel wurde aus dem Gelständer herausgenommen und in die Elektrophoreseapparatur eingebracht.

In die nach Entfernen des Kammes entstandenen Geltaschen im Sammelgel wurden dann die vorbereiteten Proben überführt, nachdem die Taschen mit Laufpuffer aufgefüllt worden waren. Beide Flüssigkeitsbehälter der Elektrophoreseapparatur wurden mit Laufpuffer gefüllt, worauf die Elektrophorese durch Anschluss an das Netzteil und Anlegen einer Spannung von 70 V begonnen wurde.

Wenn der farbige Probenpuffer bis zum Ende des Gels gelaufen war, wurden die Elektrophorese gestoppt und die Apparatur abgebaut.

Vom erhaltenen Gel wurde das Sammelgel entfernt, es wurde ausgemessen und bis zur Durchführung des Western-Blots in ein mit Blotpuffer gefülltes Behältnis gelegt.

3.2.5.3 Durchführung des Western-Blot

Es wurde hier die Methode des “semidry-Blots“ benutzt.

Sechs Whatman-Filterpapierstücke und eine PVDF-Membran mit den Kantenlängen des Gels wurden zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere wurden in Blotpuffer eingelegt, die Membran zur Aktivierung in Methanol gebadet.

Nachdem beide Elektrodenflächen des Flachbett-Blotters leicht mit H₂O befeuchtet worden waren, wurden auf die Anoden-Fläche passgenau übereinander drei der Filterpapiere, die vorher noch kurz in Blotpuffer eingetauchte Membran, das Gel und dann die verbleibenden drei Filterpapiere übereinandergelegt.

Um den Transfer behindernde Luftblasen auszuschliessen, wurde mit einer Pasteurpipette mehrmals über den Stapel gerollt, bevor der Deckel des Blotters aufgelegt und beschwert wurde.

Der Blot-Vorgang wurde bei einer Stromstärke, die sich wie folgt berechnet, für 2h vollzogen.

$$I = A \times 0,8$$

Benutzte Stromstärke: I [mA]

Fläche der Membran: A [cm²]

Nach dem Abbauen der Apparatur wurde das Gel für 1h in Coomassie-Lösung und die Membran für 5 min in Ponceau-Lösung unter gleichmässiger Bewegung auf einer Wippe gefärbt.

Diese Vorgänge machen die Proteinbanden im Gel und auf der Membran sichtbar und ermöglichen die Beurteilung der Proteinbeladung im Gel und der Effektivität des Blot-Vorgangs.

3.2.5.4 Immunfärbung

Die Darstellung von Proteinen, die im letzten Schritt auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, beruht auf spezifischer Antikörperbindung und einer Enzymreaktion, die zu Chemolumineszenz führt.

Die hierzu benötigten Antikörper können durch Immunisierung eines Tieres (meist Maus, Ziege, Ratte oder Huhn) mit dem betreffenden Protein und nachfolgende Aufreinigung des Serums gewonnen werden. Wird eine Membran, an welcher Proteine anhaften, mit einer Lösung dieser spezifischen Antikörper inkubiert, so binden diese an die Proteine und können in einem weiteren Schritt mittels Meerettich-Peroxidase-gekoppelter (engl. Horseradish-peroxidase; HRP) Zweitantikörper und einer Enzymreaktion sichtbar gemacht werden.

Man erhält also einen Komplex, der sich aus dem an der Membran immobilisierten Protein, dem Erst- und dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper besteht. Nach Zugabe eines H_2O_2 -haltigen Substrats der Peroxidase, ECL, (enhancing chemo-luminescence) werden nach einer enzymatischen Reaktion Photonen emittiert, die mit einem Film sichtbar gemacht werden können. Gründliches Waschen der Membran vor und nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wirkt unspezifischen Bindungen an andere, auf der Membran fixierte, Proteine entgegen und reduziert so den Hintergrund. Bei vergleichbarer Proteinbeladung im Gel und gleichmässigem Transfer auf die Blotmembran können mittels des Immunoblots vergleichende Aussagen zu der Proteinexpression in verschiedenen Zellen getroffen werden.

3.2.5.4.1 Durchführung

Nach der Anfärbung mit Ponceau-Lösung wurde die Membran für 45 min in Blockpuffer leicht geschüttelt. Danach wurde die Membran für 1 h mit 15 ml einer den Erstantikörper enthaltenden Blockpuffer-Lösung inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen à 10 min. Dazu wurde die Membran in einem Plastikbehälter gleichmässig bewegt.

Die darauffolgende Inkubation mit Zweitantikörper erfolgte für 1h in 15ml Zweitantikörper-Lösung. Anschliessend wurde die Membran erneut dreimal mit Blockpuffer gewaschen, dann kurz in PBS getaucht und in eine trockene Schale gelegt.

Jeweils 500 µl der H₂O₂-Lösung (Lösung 1 des ECL-Western-Blotting-Kits) und der Luminol-Lösung (Lösung 2 des ECL-Western-Blotting-Kits) wurden gleichmässig auf die Membran pipettiert und durch Bewegung der Schale verteilt.

Nach 1 min wurde die Membran dann von einer Klarsichtfolie umhüllt in die Filmkassette gelegt. Im nächsten Schritt wurden in der Dunkelkammer Filme für unterschiedliche Zeiten aufgelegt. Zunächst wurde immer eine Belichtungszeit von 1 min gewählt. Je nach Stärke des auf dem ersten Film sichtbaren Signals wurden die Belichtungszeiten variiert.

3.2.6 Vergleichende Messung der Oberflächendichte des CD95-Rezeptors mittels FACS-Analyse

Transmembranproteine können auch in intakten Zellen mit Hilfe einer Immunfärbung sichtbar gemacht werden. Das Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung wird hierbei in ganz ähnlicher Weise wie beim Immunoblot ausgenutzt.

Die von einer Zelle exprimierten Proteine können mit spezifischen Antikörpern und Fluorochrom-konjugierten Zweit-Antikörpern komplexiert werden und durch die im FACS detektierte Fluoreszenz quantifiziert werden.

3.2.6.1 Durchführung

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und in 5 ml Polystyren-Röhrchen überführt. Nach Resuspendierung der Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette wurden die Zellkonzentrationen der Suspensionen bestimmt.

Pro Ansatz wurden dann fünf Polystyren-Röhrchen mit einem 1×10^5 Zellen entsprechenden Volumen ausgestattet und einer Zentrifugation bei 200g für 5 min bei RT unterzogen. Danach wurden das Medium verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 200g für 5 min bei RT wurde der PBS abgesaugt und die Inkubation mit Erstantikörperlösung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 200µl PBS mit einer Konzentration eines Antikörpers von etwa 10 ng/ml resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Zwei der jeweils fünf Röhrchen wurden als Kontrollen verwendet, d.h. eine wurde nicht mit Antikörpern und eine nur mit dem Zweitantikörper, ansonsten aber den anderen Röhrchen entsprechend behandelt. Nach der halbstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen

dreimal mit 2ml PBS gewaschen - nach jedem Schritt wurden die Röhrchen jeweils 5 min bei 200g bei RT zentrifugiert - und anschliessend mit fluorchrom-gekoppeltem Zweitantikörper ebenfalls für 30min lichtgeschützt und auf Eis inkubiert.

Dem erneuten dreimaligen Waschen folgte die Messung im FACS.

Es wurde ein spezifischer Maus-Antikörper gegen CD95 (Klon 2R2) und als Zweitantikörper ein FITC-gekoppelter, gegen Maus gerichteter Ziegen-Antikörper benutzt.

3.2.7 Zellzyklusprofilanalyse mit Propidiumiodidanfärbung

Propidiumiodid als interkalierender Farbstoff kann mit Hilfe der durch das FACS-Gerät gemessenen Fluoreszenz einzelner Zellen Aufschluss geben über deren DNA-Gehalt und somit über die Verteilung im Zellzyklus. Voraussetzung ist hierbei die Beseitigung der zellulären RNA, da PI auch diese anfärbt, und die Permeabilisierung der Zellen und des Zellkerns, z.B. durch Ethanol.

3.2.7.1 Ernten und Fixieren der Zellen

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und samt ihrem Medium in Polystyren(PS)-Röhrchen überführt und bei 500 g für 15 min bei RT zentrifugiert, um den Verlust von apoptotischen Zellen zu verhindern. Der Überstand wurde dann abgesaugt, und die Zellen wurden durch tropfenweise Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol (70 %) fixiert.

Nach Fixierung wurden die PS-Röhrchen mit Parafilm verschlossen und vor dem Vermessen mindestens über Nacht im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Die Zugabe des Ethanols hat nicht nur die Funktion, die Proben haltbar zu machen, sondern permeabilisiert die Zellmembranen zusätzlich, wodurch ein Eindringen des Propidiumiodids in den Zellkern gewährleistet wird.

3.2.7.2 Färbung

Um die Proben zu waschen, wurden zu den fixierten Zellen je 2 ml Na-Citrat (38 mM) pipettiert. Die Röhrchen wurden darauf bei 500 g bei RT für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden auf das zurückbleibende Zellpellet 500 µl der PI-Färbungslösung gegeben. Danach wurde durch Vortexen resuspendiert.

Die PS-Röhrchen wurden dann für 20 Minuten bei 37° C inkubiert und anschliessend im FACS vermessen.

3.2.7.3 FACS-Messung

Die Messung der Proben wurde im FL-2-Kanal (detektierter Wellenlängenbereich: 564-606 nm, Rot) des FACS vorgenommen. Die Parameter wurden mit Hilfe von Kontrollproben, in denen keine apoptotischen Zellen vorhanden waren, in einem Akquisitions-Fenster, das FL-2-W (engl. width) gegen FL-2-A (engl. area) zeigte, so eingestellt, dass die Zellansammlung, die der G₁-Phase entspricht, bei beiden Achsen etwa bei dem Wert von 200 Fluoreszenz-Einheiten zu liegen kam (siehe Abbildung 2.1). Dieses Vorgehen führt dazu, dass die Zellansammlung, die die Zellen in der G₂/M-Phase umfasst, im Bereich des FL-2-A-Werts von 400, also der doppelten Fluoreszenz-Intensität, zu finden ist, da diese Fluoreszenz dem doppelt diploiden Chromosomensatz entspricht. Bei diesen Messungen wurden stets 15.000 bis 30.000 Zellen aufgenommen.

Nach der Messung wurden die Daten abgespeichert und mittels der Software CellQuest Pro in einem Diagramm dargestellt und ausgewertet.

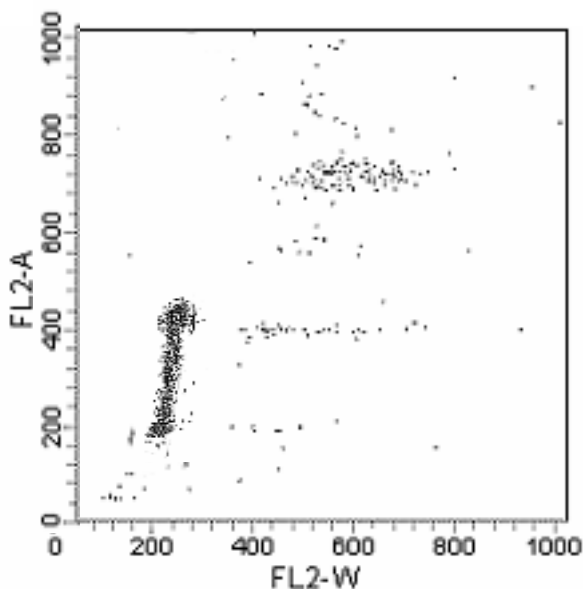


Abbildung 2.1: Die Einstellung der G₁-Zellwolke auf einer Fluoreszenzintensität von 200 auf der FL-2-A- und der FL-2-W-Achse wurde durch Veränderungen der Verstärkung vorgenommen.

3.2.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels des JC-1-Farbstoffs

Um den Zustand des mitochondrialen Membranpotentials zu untersuchen und damit Aussagen über den apoptotischen Zelltod in den verschiedenen Zellpopulationen treffen zu können, wurde der Farbstoff JC-1 verwendet.

Der kationische, lipophile Farbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) akkumuliert in sogenannten J-Aggregaten in der Membran von Mitochondrien mit intaktem Membranpotential. Diese Aggregate zeigen ein

Fluoreszenzmaximum bei der Wellenlänge von 597 nm, das im FL-2-Kanal des FACS gemessen werden kann [Cossarizza et al., 1993; Reers et al., 1995]. Ein Abfallen des Membranpotentials verursacht eine Veränderung in der Zustandsform von JC-1 und ein Zerfallen der J-Aggregate zu Monomeren, was mit einer Änderung der Fluoreszenz einhergeht. Die monomere Form von JC-1 besitzt ein Fluoreszenzmaximum bei der Wellenlänge von 537 nm, die im FL-1-Kanal des FACS gemessen werden kann.

Somit ist es möglich, in Zellpopulationen den Zustand des mitochondrialen Membranpotentials vergleichend zu beurteilen.

3.2.8.1 Durchführung

Die Zellen wurden geerntet und samt des Mediums in ein 5ml Polystyren-Röhrchen überführt. Es folgten eine Zentrifugation bei 200 g für 5 min bei RT und das Absaugen des Mediums. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und dann in JC-1-Lösung resuspendiert, bevor sie lichtgeschützt für 20 min bei 37° C zur Inkubation belassen wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Röhrchen auf Eis gestellt und im FACS vermessen. Dabei wurden die Kanäle FL-1 und FL-2 aufgenommen. Zur Auswertung wurden die beiden Kanäle im Dotplot dargestellt und das Verhältnis der Fluoreszenz von den hauptsächlich in FL-1 strahlenden zu den hauptsächlich in FL-2 strahlenden Zellen berechnet. Dies wurde mit Hilfe von zwei Gates, die über und unter einer Winkelhalbierenden angelegt wurden, erreicht.

3.2.9 Fluometrische Aktivitätsbestimmung von Caspase-3, -8 und -9

Zur fluometrischen Bestimmung der Aktivität von Caspase-3, -8 und -9 in Zelllysaten wurde das Fluorometric Protease Assay Kit (BioVision/Wertheim, Deutschland) verwendet.

Bei dieser Methode bedient man sich unterschiedlicher, für einzelne Caspasen jeweils spezifischer synthetischer Substrate, die von den Caspasen gespalten werden und dabei ihr Emmissionsspektrum verändern. So ist es möglich, die Menge des umgesetzten Substrats fluorometrisch zu messen und auf die Aktivität einzelner Caspasen zu schliessen. Die Fluoreszenzintensität verhält sich hierbei proportional zu der Menge aktivierter Caspase.

3.2.9.1 Ernten der Zellen

Die Zellen wurden zuerst mittels Zellschaber von den Zellkulturschalen abgelöst, geerntet und samt Medium jeweils in ein 15 ml Polypropylen(PP)-Röhrchen überführt. Die Zellkonzentration der Suspensionen wurden hiernach mit dem Coulter-Counter ermittelt und in $1,5 \times 10^6$ Zellen enthaltende Volumina in 15 ml- Polypropylen(PP)-Röhrchen aufgeteilt.

Es folgte eine Zentrifugation bei 500 g für 5 min bei RT sowie das Absaugen des Mediums. Die Zellpellets wurden dann in 5 ml PBS resuspendiert, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei 500 g für 5 min und Absaugen des PBS.

Hierauf wurden die Pellets jeweils in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die dann in der Tischzentrifuge bei 500 g 5 min lang bei RT zentrifugiert wurden.

Der Überstand in den Reaktionsgefäßen wurde durch Absaugen entfernt und die Zellpellets zum Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff gegeben. Nach der Stickstoffbehandlung wurden die Reaktionsgefäße bei -80°C gelagert.

3.2.9.2 Caspase-Assay:

Die in Reaktionsgefäßen eingefrorenen, $1,5 \times 10^6$ Zellen enthaltenden Zellpellets wurden in 50 μl Lyse-Puffer (im Fluorometric Protease Assay Kit enthalten) durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen, bevor 50 μl des frisch mit DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzten 2x Reaktions-Puffers (im Fluorometric Protease Assay Kit enthalten) zugefügt wurden.

Nach Vortexen und kurzem Abzentrifugieren wurde das Gesamtvolumen auf drei Vertiefungen einer 96-well-Platte verteilt, so dass pro Vertiefung ein Volumen von 33 μl , entsprechend einer Menge von ca. 5×10^5 Zellen, vorhanden war. Zu diesem Volumen wurden 3 μl des der jeweiligen Caspase zugeordneten Substrats zugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze damit vermischt.

Die Proben wurden für 1h bei 37°C inkubiert und danach im Fluorometer vermessen.

3.2.10 RNA-Isolierung und Microarrays

Die Gesamtheit der Boten-RNAs (messenger-RNA, mRNA) als Informationsübermittler zwischen der DNA und der Protein-Synthese-Maschinerie spiegelt teilweise die Protein-Expressionsmuster der Zelle wider.

Durch verschiedene Technologien ist es möglich geworden, nach Isolierung und Untersuchung der Gesamt-RNA unterschiedlicher Zellpopulationen, Aussagen über die Quantität einzelner mRNAs zu treffen und damit Rückschlüsse auf die in den Zellen translatierten Proteine zu ziehen – hierbei muss allerdings gesagt werden, dass die Translation einer mRNA nicht nur von ihrer Konzentration abhängt, sondern noch von diversen anderen Faktoren, so dass nicht immer von der Konzentration einer mRNA auf die Expression des entsprechenden Gens geschlossen werden kann.

Microarrays - auch als Expressionsarrays oder Gen-Chip Arrays bezeichnet - bieten durch ihre Parallelisierung und Miniaturisierung eine einfache Methode zur Herstellung von Expressionsprofilen, die tausende Genen umfassenen.

3.2.10.1 Funktionsweise der Microarrays

Die Technik der Microarrays beruht im Wesentlichen auf der komplementären Hybridisierung von auf einer Matrix fixierten Sonden-Oligonukleotiden mit den aus der Gesamt-RNA hergestellten, fluoreszenzmarkierten cRNAs.

Die bestimmten Genen entsprechenden Sonden-Oligonukleotide werden auf die Matrix in einem geordneten Muster durch Photoimmobilisierung aufgebracht.

Zur Untersuchung der RNA-Expression muss diese zuerst aus den Zellen extrahiert und im nächsten Schritt einer reversen Transkription unterzogen werden, um cRNA zu erhalten.

Nach Hybridisierung der Chips mit der Proben-cRNA ist es durch Messung der Fluoreszenz möglich, die Menge der cRNA einzelner Gene zu bestimmen.

Die Herstellung der cRNAs, die Durchführung der Microarrays und die Auswertung der Daten wurde freundlicherweise im Labor von Prof. Möröy von Dr. Klein-Hitpass (Universitäts-Klinikum Essen) durchgeführt. Es wurden hierbei Affymetrix-Chips verwendet. Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen vorgenommen.

3.2.10.2 Durchführung der RNA-Isolierung

Die Zellen wurden mittels Zellschaber geerntet, in 15 ml PP-Röhrchen überführt und für 5 min bei 500 g zentrifugiert, nachdem noch ein kleines Aliquot der Zellsuspension für eine PI-Kontrolle abgenommen worden war.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellpellets mit 5 ml PBS gewaschen und nochmals bei 500 g zentrifugiert bei 0° C, bevor sie zur Lyse in 600 µl RLT-Puffer (mit β-Mercapto-Ethanol in der Endkonzentration von 0,143 M versetzt) resuspendiert wurden.

Die Proben wurden durch fünfmaliges Aufziehen und Ausstossen durch eine 0,9 mm Kanüle homogenisiert.

Es wurden dann 600 µl 70 %igen Ethanols hinzugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze mit dem Lysat vermischt.

700 µl dieses Gemisches wurden auf eine RNeasy Minisäule gegeben und bei 200 g für 1 min bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Im nächsten Schritt, bei dem 700 µl des RW1-Puffers auf die Säule gegeben wurden, um sie zu waschen, wurde dasselbe Sammelgefäß wiederverwendet.

Nach Zentrifugation bei 500 g für 15 s wurde das Sammelgefäß gegen ein neues ausgetauscht. Zum erneuten Waschen der Säule wurden nun 500 µl des RPE-Puffers (in Ethanol verdünnt) auf die Säule gegeben, die nochmals bei 500 g für 15 s bei RT zentrifugiert wurde.

Der letzte Schritt wurde wiederholt, um die Säule zu trocknen, es wurde allerdings für 2 min zentrifugiert.

Auf die Säule, die mit einem neuen Sammelgefäß (1,5 ml) ausgestattet worden war, wurden dann 50 µl RNase-freies Wasser gegeben, mit dem durch Zentrifugation mit 500 g für 1 min die RNA eluiert wurde.

5 µl der RNA-Lösung wurden für die Bestimmung der Konzentration abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung der optischen Dichte bei -20° C eingefroren.

3.2.10.3 Messung der optischen Dichte (OD)

RNA besteht aus Pyrimidinen und Purinen, deren delokalisierte Π -Elektronen in ihrem Ringsystem Licht der Wellenlänge von 260 nm absorbieren.

Dies ermöglicht die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen mit der Formel:

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 44,19 = \text{RNA } \mu\text{g/ml}$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm

44,19: Extinktionskoeffizient der RNA

Zusätzlich kann mit den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm die Verunreinigung der Proben mit Proteinen bestimmt werden, da Licht der Wellenlänge 280 nm von den Π -Elektronen der aromatischen Aminosäuren absorbiert wird. Der Quotient sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2 liegen.

3.2.10.3.1 Durchführung

5 μ l der RNA-Lösung wurden 1:100 mit H_2O versetzt und in eine Mikroküvette pipettiert.

Die Absorption wurde bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm in Bezug auf einen Nullwert (nur H_2O) gemessen.

3.2.10.4 Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE)

Ein eventueller enzymatischer Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen muss vor der cDNA-Synthese ausgeschlossen werden. Die Integrität der gelösten RNA wurde mittels eines Agarose-Gels überprüft.

Das Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE) beruht darauf, dass RNA eine negative Ladung aufweist, also in einem unter Spannung stehenden Agarose-Gel, welches aus quervernetzten Agarosepolymeren besteht - das heißt, eine netzartige, dem Polyacrylamid-Gel ähnliche Struktur aufweist - zur Anode wandert.

Die RNA kann mit Hilfe von Ethidium-Bromid visualisiert werden, indem das zwischen den Basen interkalierte Ethidium-Bromid durch UV-Licht ($\lambda = 366\text{nm}$) zum Fluoreszieren angeregt wird. Dies ermöglicht das Visualisieren von RNA-Banden unter dem UV-Transluminator.

3.2.10.4.1 Durchführung der Elektrophorese

400 ml mit DEPC-Wasser angesetzter 0,5 x TBE-Puffer wurden mit 1 % erhitzter Agarose versetzt.

0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid wurden zugefügt, bevor das noch flüssige Gel in den horizontalen Flachbettgelträger gegossen wurde.

Nach Erstarren des Gels wurde ein 2 μg RNA entsprechendes Volumen, das zuvor mit 6x RNA-Lade-Puffer im Verhältnis 1:6 vorsichtig vermengt worden war, in die Geltaschen überführt.

Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V für 2 bis 3 h durchgeführt.

Unter dem Transluminator wurde das Gel überprüft und photographisch festgehalten. Als intakt wurde die RNA angesehen, bei der zwei scharf abgegrenzte Banden, die der 18S- und der 28S-rRNA entsprechen, zu sehen waren.

3.2.11 Immunopräzipitation des "death-inducing signaling complex" (DISC)

Das Prinzip der Immunopräzipitation von Proteinkomplexen beruht darauf, dass die Zerstörung physiologischer Interaktionen von Proteinen untereinander durch bestimmte, besonders schonende Lyse-Puffer bei der Herstellung von Zelllysaten unter Umständen verhindert werden kann. Die intakten Proteinkomplexe können dann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die gegen ein im Komplex enthaltenes Protein gerichtet sind, und Protein-A-gekoppelten Sepharose-Kügelchen, sogenannte "Sepharose-Beads", aus dem Gesamtprotein-Extrakt isoliert werden.

Protein-A ist ein natürlicherweise auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* vorkommendes, als Pathogenitätsfaktor geltendes Protein, das den F_c-Teil von Antikörpern zu binden vermag. So können Antikörpern, die gegen ein bestimmtes Protein gerichtet sind, mit gebundenen Proteinkomplexe aus der Lösung zentrifugiert werden.

Im Fall der DISC-IP wurden Antikörper gegen den Flag-Anteil des rekombinant hergestellten CD95L verwendet.

Die Zusammensetzung und Funktion des DISC wurde in der Einleitung unter Abschnitt 1.1.5.1 beschrieben. Die DISC-Immunopräzipitation wurde durchgeführt, um Unterschiede in der DISC-Zusammensetzung bei Zellen zweier unterschiedlicher Zustände (hohe Zelldichte und niedrige Zelldichte, siehe Abschnitt 1.4) zu untersuchen.

3.2.11.1 Durchführung der Immunpräzipitation

RKO-Zellen wurden in grossen Kulturschalen in zwei unterschiedlichen Zelldichten (*hohe Zelldichte*: $2,5 \times 10^7$ Zellen pro Schale und *niedrige Zelldichte*: $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale - in 15 ml frischem Medium) ausgesät und über 48 h kultiviert.

Insgesamt wurden für den dichten Ansatz 2 Kulturschalen (eine Schale zur Inkubation mit CD95L und ein Kontrollansatz) vorbereitet, für den dünnen Ansatz hingegen 8 Schalen (je 4 Schalen für CD95L-Inkubation und Kontrollansatz), um Unterschiede in der Proteinkonzentration in den Lysaten zu nivellieren.

CD95L wurde 48 h nach der Aussaat in der Konzentration von 50 ng/ml zugefügt, anti-Flag-Antikörper in einer Konzentration von 10 ng/ml.

Die Zellen wurden dann nach 90 minütiger Inkubation mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, mitsamt des Mediums aufgenommen und je nach Ansatz in ein 50 ml Polypropylen(PP)-Röhrchen überführt, wobei die dünnen Ansätze gepoolt wurden.

Die PP-Röhrchen wurden dann für 5 Minuten bei 500 g in der auf 4° C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert und das Medium abgesaugt.

Nach einem Waschschrift mit 5 ml eiskaltem PBS wurde das Pellet vorsichtig in 1 ml ebenfalls eiskalten DISC-IP-Lyse-Puffer aufgenommen und in 1 ml-Reaktionsgefäße überführt.

Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 min, nach der die Reaktionsgefäße bei 14.000 g für 15 min bei 4° C zentrifugiert und abgesaugt wurden.

Das Pellet wurde dann nochmals in 1ml DISC-IP-Lyse-Puffer aufgenommen und in 1 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen vorher 50µl Beads-Suspension (1 mg Beads/ml Lyse-Puffer) vorgelegt worden war.

Zusätzlich zu den 50 µl der Beads-Suspension waren zu den Kontrollansätzen noch 1 µl CD95L-Lösung (entsprechend: 10 pg CD95L) und 1 µl anti-Flag-Antikörper-Lösung (entsprechend: 1ng anti-Flag-Antikörper) zugegeben worden.

Die Reaktionsgefäße wurden bei 4° C für 2 h durch kontinuierliche Rotation durchmischt. Dies sollte die Bindung der Antikörper an die Beads ermöglichen.

Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße bei 14.000 g bei 4° C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, das zurückbleibende Pellet hingegen fünfmal mit jeweils 1 ml DISC-Lyse-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 14.000 g und 4° C über 1 min, anschliessendes Absaugen).

Die Beads wurden dann mit 50 µl Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 95° C gekocht, um die Dissoziation der Antikörper von den Beads zu bewirken.

20 µl des im vorherigen Arbeitsschritt abgenommenen Überstandes wurden mit 20 µl Probenpuffer vermischt und ebenfalls für 5 min aufgekocht.

Alle Proben wurden anschliessend auf ein 13%iges Acrylamid-Gel aufgetragen und wie in Abschnitt 2.2.5 erläutert einer Gelelektrophorese und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie der Zellen

Um einen Effekt der Zelldichte auf das Proliferationsverhalten zu zeigen, wurden die RKO-Zellen, wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben, in zwei unterschiedlichen Zelldichten kultiviert.

Die Zellkulturen wurden täglich lichtmikroskopisch morphologisch begutachtet, um mögliche Fehlerquellen, wie bakterielle oder mykotische Verunreinigungen frühzeitig zu erkennen. Das mikroskopische Erscheinungsbild 24 h nach Aussaat (d.h. zum Zeitpunkt der CD95L-Zugabe) zeigte folgende Unterschiede:

Während die zu etwa 20 bis 30 % konfluenten, dünn ausgesäten Kulturen flach ausgestreckt liegende Zellen mit Cytoplasmaausstülpungen zeigten, waren die Zellen in den dicht ausgesäten Kulturen zumeist kleiner und abgerundet. Auffällig war, dass letztere eine geringere Adhäsion aufwiesen als die dünn ausgesäten Zellen, was aber auch daran liegen könnte, dass der Zellrasen in den dicht ausgesäten Kulturen teilweise mehrschichtig wurde. 24h nach CD95L-Inkubation zeigten sich in den dünnen Kulturen zahlreiche apoptotisch veränderte Zellen, während sich das Erscheinungsbild der dicht-ausgesäten Kulturen kaum änderte.

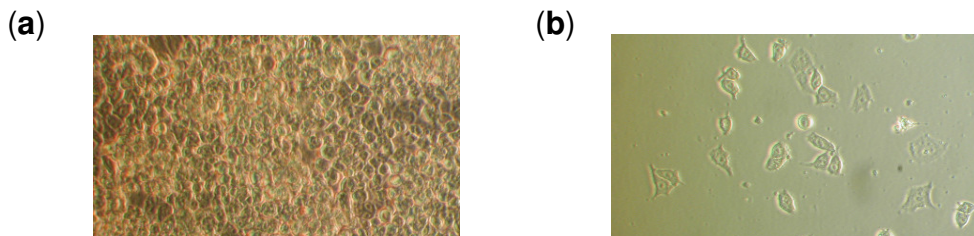


Abbildung 4.1: 40x Vergrößerung einer dicht ausgesäten (a) und einer dünn ausgesäten (b) RKO-Zellkultur

4.2 PI-Messungen

Um das Wachstum - vor allem die erwünschte Abnahme der Proliferationsrate - und das Ausmaß der auf CD95L-Inkubation folgenden Apoptose der beiden verschiedenen Ansätze zu vergleichen, wurden Zellzyklusprofile mittels der PI-Anfärbemethode (siehe Abschnitt 2.2.7) gewonnen. Dabei wurden gleichzeitig die hypoploiden Zellen (Zellen im „subG₁“-Peak) quantifiziert.

4.2.1 Dicht ausplattierte RKO-Zellen zeigen eine G₁-Akkumulation

Die Zellzyklus-Profile zeigten deutliche Unterschiede zwischen beiden Ansätzen: während die dünn ausgesäten Zellkulturen in ihrem Zellzyklus-Profil G₁-Phasen von durchschnittlich 45 % (SD: ~4 %) und entsprechend hohe S- (Mittelwert: 28 % [SD: ~2,5 %]) und G₂M-Phasen (Mittelwert: 24 % [SD: ~3 %]) zeigten, waren in den dicht ausgesäten Zellkulturen prominente G₁-Phasen von durchschnittlich 60 % (SD: ~2,5 %) auffällig, die mit einer verringerten Zellzahl in den beiden anderen Zellzyklus-Phasen einherging (S-Phase: 20 % [SD: ~3 %]; G₂M-Phasen: 15 % [SD: ~3 %]; vergleiche Abbildung 4.2 und 4.3).

Desweiteren fielen in den dichten Kontrollansätzen regelmässig minimal erhöhte subG₁-Phasen (Mittelwert: 5 % [SD: ~2 %] im Vergleich zu 3 % [SD: ~1 %] in dünn ausgesäten) auf.

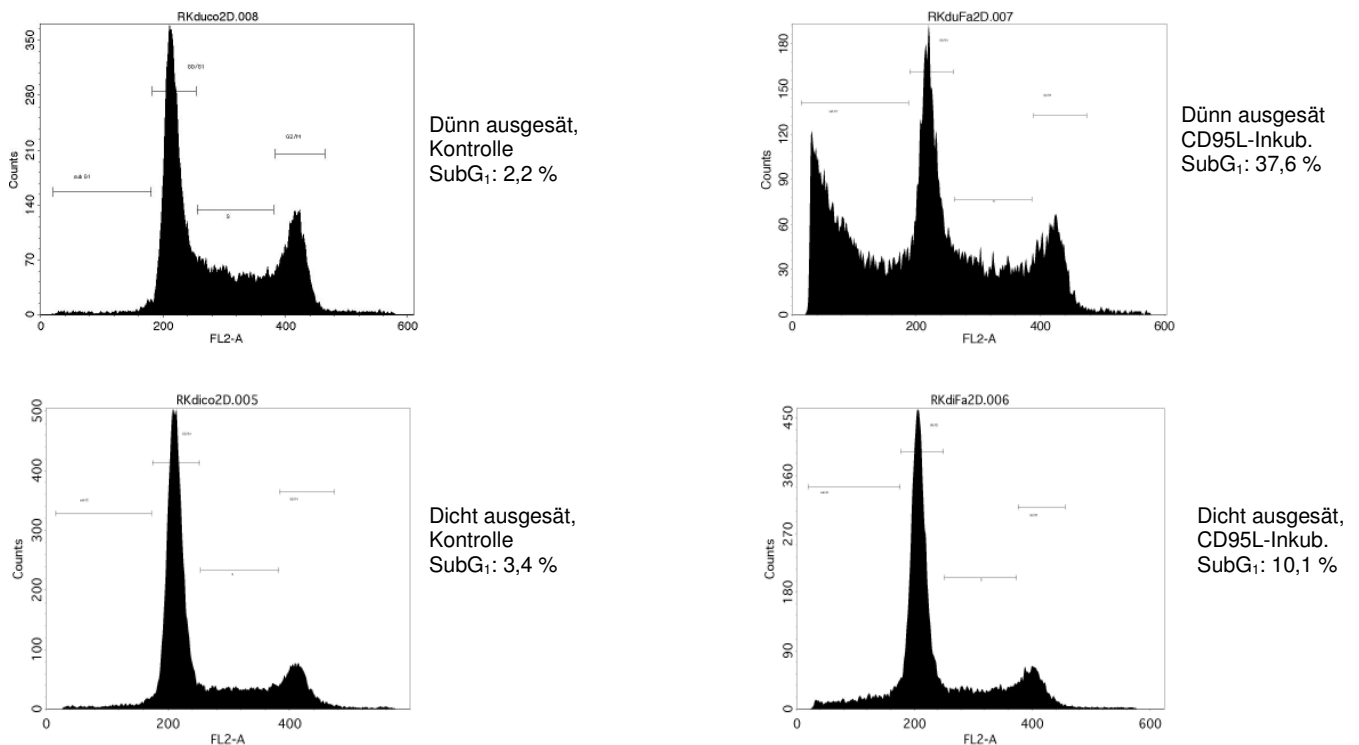


Abbildung 4.2: Zellzyklusprofile von dicht und dünn ausgesäten Zellkulturen, mit und ohne CD95L-Behandlung: Die hier exemplarisch gezeigten, durch PI-FACS-Analyse gewonnenen Zellzyklusprofile zeigen eine G₁-Akkumulation in den dicht ausgesäten RKO-Zellkulturen, die als verringerte Proliferation gewertet wurde, und einen damit einhergehenden, verminderten subG₁-Anteil in den dicht ausgesäten mit CD95L behandelten Zellkulturen, der als Protektion gegenüber CD95L-induzierter Apoptose aufgefasst wurde. Die Zellen wurden 24h nach Aussaat mit 20ng/ml CD95L, 1µg/ml anti-Flag-Antikörper und 100ng/ml Cycloheximid behandelt oder unbehandelt als Kontrollzellen belassen und nach weiteren 24h geerntet und Ethanol-fixiert.

4.2.2 Dicht ausplattierte RKO-Zellen zeigen eine geringere Sensitivität gegenüber CD95L

Der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamt-Zellpopulation wurde mittels PI-Färbung, FACS-Messung und anschliessender Quantifizierung des subG₁-Peaks, wie in Abschnitt 2.2.7.3 des Methodenteils beschrieben, ermittelt. Es wurde dabei das Programm CellQuestPro von BD Biosciences verwendet.

Beim Vergleich der mit CD95L inkubierten Ansätze fiel auf, dass die dichten Ansätze im Vergleich zu den dünnen einen sehr viel geringeren Anteil an Zellen im subG₁-Peak aufwiesen. Während in dicht-ausgesäten Zellkulturen durchschnittlich nur 13 % (SD: ~8 %) der Zellen im subG₁-Peak zu finden waren, zeigten die dünn-ausgesäten Zellkulturen einen durchschnittlichen subG₁-Anteil von 45 % (SD: ~11 %). Die dichten Ansätze schienen also gegenüber CD95L-induzierter Apoptose weniger sensitiv zu sein.

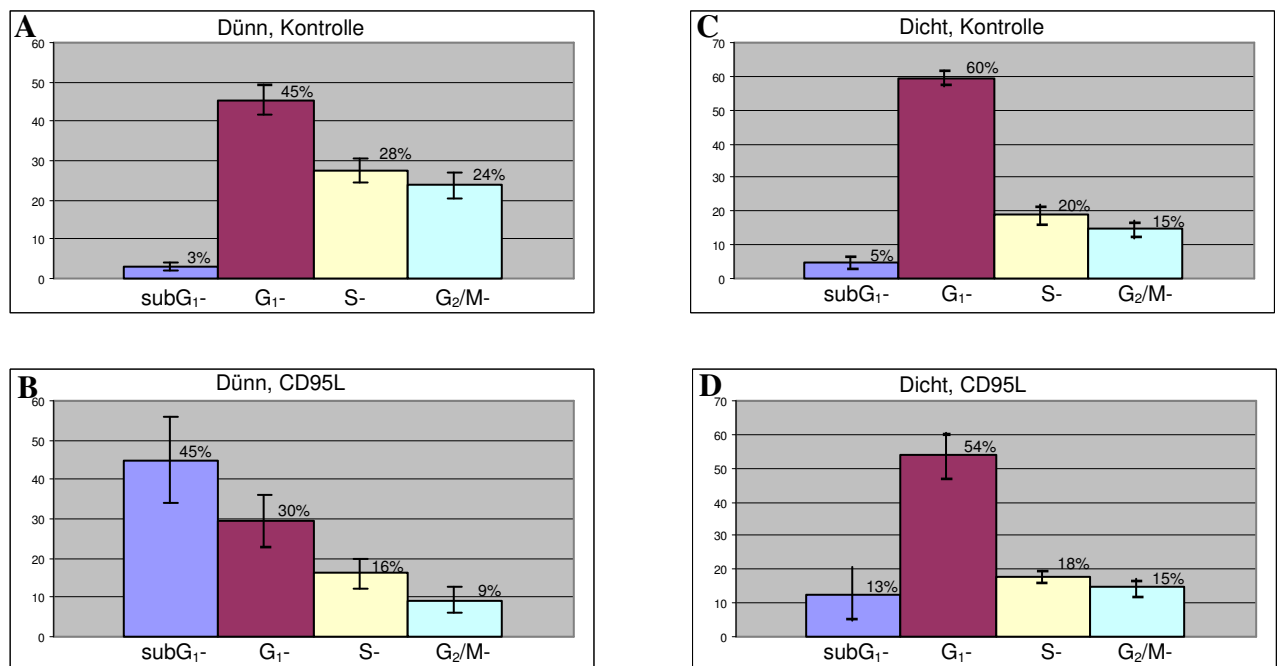


Abbildung 4.3: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen:

- A: dünn ausgesäte Kontrollzellen;
- B: dünn ausgesäte CD95L-inkubierte Zellen;
- C: dicht ausgesäte Kontrollzellen;
- D: dicht ausgesäte CD95L-inkubierte Zellen;

In den Diagrammen sind die Ergebnisse von 8 Einzelexperimenten zusammengefasst. Es zeigt sich bei den dicht ausgesäten Zellen eine Akkumulation in der G₁-Phase sowie eine Protektion gegenüber CD95L in dichten Kulturen.

Die interexperimentellen Abweichungen der Apoptoserate (Standardabweichung des subG₁-Anteils bei dünn ausgesäten, mit CD95L-behandelten Kulturen: ~11%) der einzelnen Versuche lassen sich am ehesten auf die Qualität der unterschiedlichen CD95L-Präparationen, Pipettierfehler oder auf einen unterschiedlichen Zustand der Zellen zurückführen.

Wurden Zellen aus dichten Zellkulturen weiter passagiert und mit frischem Medium ausgestattet, so verhielten sie sich wie normal passagierte Zellen, ohne Verringerung der Sensibilität gegenüber CD95L (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.3 Bei dünn und dicht ausplattierten Zellen besteht kein relevanter Unterschied in der CD95-Rezeptorendichte

Wie im Methodenteil unter Abschnitt 2.2.6 beschrieben, wurden die relativen Mengen des auf der Zelloberfläche exprimierten CD95-Rezeptors bei dünnen und dichten Kontrollzellen gemessen. Mit dem Programm CellQuestPro konnten die Messergebnisse in einem Diagramm dargestellt werden, welches die Anzahl der Zellen zum Logarithmus der Fluoreszenzstärke in Beziehung setzte (siehe Abbildung 4.4).

CellQuest ermöglichte es weiterhin, die durchschnittliche Fluoreszenz ("Mean") der so aus den verschiedenen Versuchen erhaltenen Diagramme anzugeben.

Durch Subtraktion des Durchschnittswertes der nur mit Zweitantikörper gefärbten Probe von dem der mit Erst- und Zweitantikörper gefärbten Probe wurde ein vergleichbarer Wert für die CD95-Oberflächendichte generiert (siehe Abbildung 3.4).

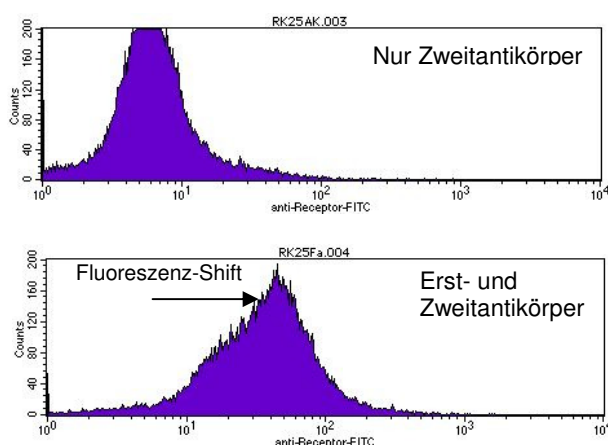


Abbildung 4.4: exemplarische Fluoreszenz-Diagramme bei der Messung der Rezeptorendichte:

Die logarithmisch dargestellten Fluoreszenz-Intensitäten der beiden Ansätze (oben nur Zweitantikörper, unten Erst- und Zweitantikörper) wurden mit Hilfe von CellQuestPro subtrahiert und ergaben so den Betrag des Fluoreszenz-Shifts. Als anti-CD95-Erstantikörper wurde 2R2 (Alexis) verwendet. Zweitantikörper war ein FITC-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper.

Es ergaben sich in 6 Messungen teils widersprüchliche Ergebnisse mit hoher Standardabweichung (dünn ausgesät SD: ~21; dicht ausgesät SD: ~19), wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist.

Der höhere Mittelwert der dünnen Kontrollzellen deutet darauf hin, dass der CD95-Rezeptor in leicht stärkerem Maße auf den Membranen der dünn-ausgesäten Zellen präsentiert wird (Mittelwert: dünn=65; dicht=58; siehe Abbildung 4.5).

Werden diese Zahlen aber vor dem Hintergrund gesehen, dass sie aus relativ hohen Primärdaten errechnet wurden, und dass die Abweichungen zwischen den einzelnen Experimenten relativ hoch sind, während die Unterschiede zwischen den beiden Zuständen (dicht/dünn) bei 3 der 5 Messungen eher marginal sind, kann man das Ergebnis dieser Messreihe als Hinweis auf eine nahezu gleiche CD95-Rezeptordichte auf Zellen der dichten und der dünnen Ansätze interpretieren.

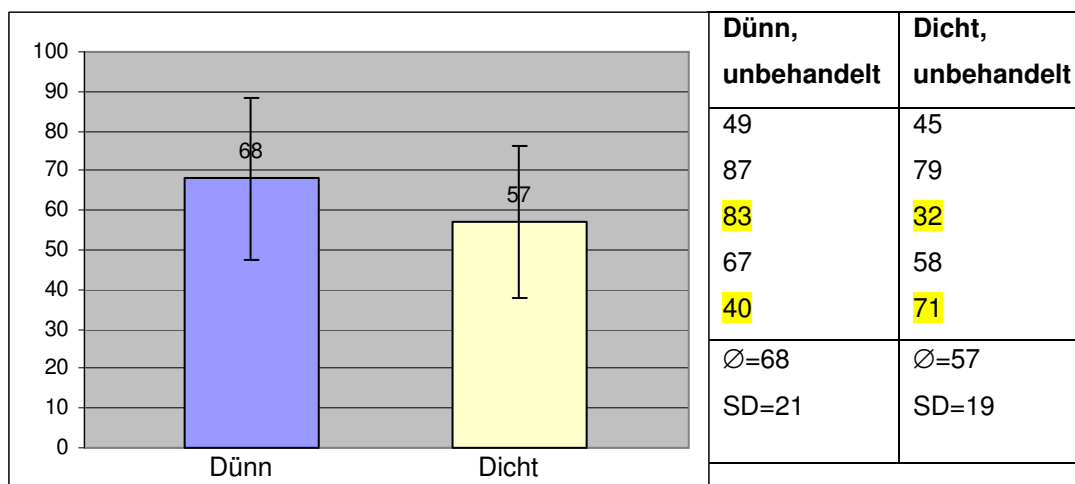


Abbildung 4.5 Zusammengefasste Ergebnisse der CD95-Rezeptor-Dichtemessungen: Die dargestellten Werte ergaben sich aus der Subtraktion der Fluoreszenzwerte von Proben, die mit Erst- und Zweitantikörper behandelt wurden, vom Fluoreszenzwert nur mit Zweitantikörper behandelter Proben. Die rechts abgebildete Tabelle zeigt die, dem Balkendiagramm zugrunde liegenden Messwerte von 5 unabhängigen Versuchen, bei denen die Zellen der beiden Zustände (dicht/dünn ausgesät) 48h nach Aussaat geerntet und im FACS vermessen wurden. Stark abweichende Messergebnisse sind gelb hervorgehoben. SD = Standardabweichung.

Die Expression des CD95-Rezeptors wurde zusätzlich mittels Western-Blot überprüft. Die Gesamtmenge des CD95-Rezeptors im Western-Blot scheint entsprechend der Rezeptormenge an der Zelloberfläche bei beiden Zuständen gleich zu sein (Abbildung 4.5). Dieses Ergebnis konnte bei drei Versuchen zuverlässig reproduziert werden.

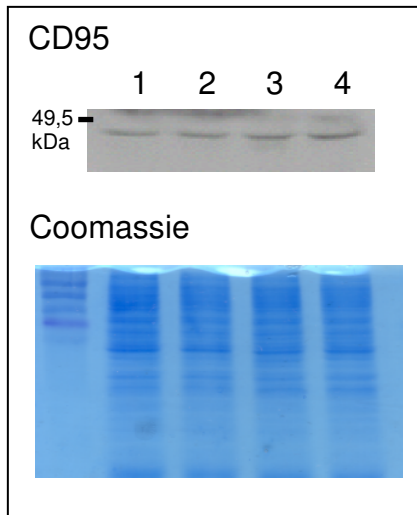


Abbildung 4.6: Immuno-Blot zur Detektion des CD95-Rezeptors mit dazugehörigem Coomassie-gefärbtem Gel als Ladekontrolle.

Es wurde der Antikörper Apo 1-3 (Alexis) verwendet. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Beladung: 10µg pro Lane. Der Versuch wurde drei Mal mit identischem Ergebnis wiederholt.

1: Dünn, Kontrolle

2: Dünn, CD95L

3: Dicht, Kontrolle

4: Dicht, CD95L

4.4 Die Zusammensetzung des DISC-Komplexes zeigt bei dünn- und dicht-ausplattierten Zellen keine Unterschiede

Im nächsten Schritt sollten eventuelle Unterschiede in der Zusammensetzung des DISC-Komplexes untersucht werden. Es ergaben sich bei dieser Untersuchung gewisse Unterschiede bei der Proteinbeladungen der verschiedenen Ansätze, die sich bei den Immuno-Blots durch unterschiedlich dicke Banden, z.B. auch bei Immunodetektion des CD95-Rezeptors, oder auch bei den Bahnen, die Gesamtzelllysate enthielten (siehe Abbildungen 4.7 und 4.8), auswirkte. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Rekrutierung von FADD oder Caspase-8 zum intrazellulären CD95-Komplex festgestellt werden. Auch die dichten Kulturen zeigten eine grosse Menge an im DISC gebundener Procaspase-8 sowie eines Caspase-8-Spaltprodukts.

c-FLIP (FLIP_L und FLIP_S) konnte bei mehreren Versuchen nicht in RKO-Zellen im Western-Blot nachgewiesen werden - anscheinend wird es von dieser Zellart nicht oder in nicht nachweisbaren Mengen exprimiert. Hierbei wurde der Antikörper NF6 (Alexis, Grünberg) verwendet.

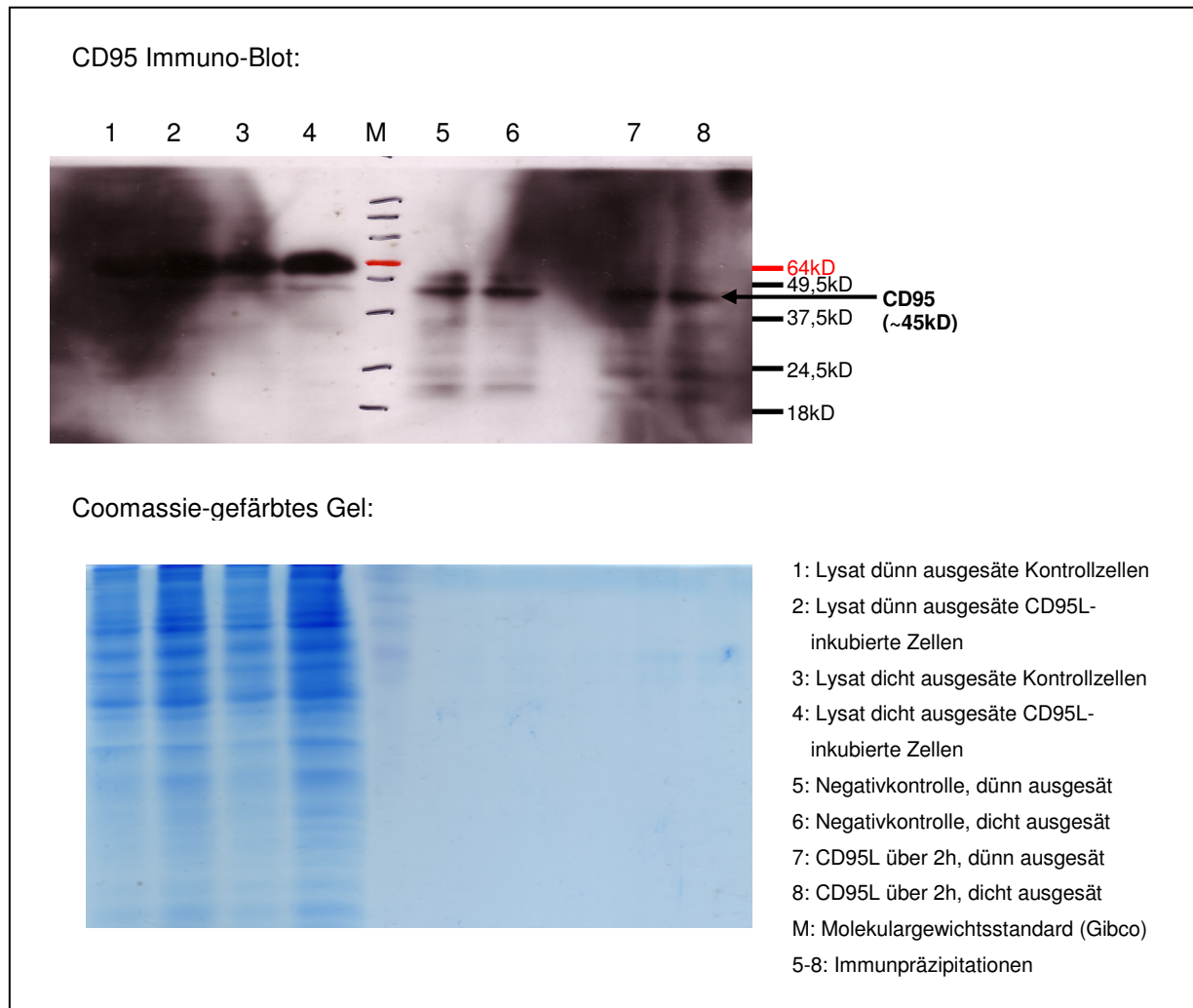


Abbildung 4.7: CD95-Rezeptor-Immunoblot der DISC-Präzipitation und Coomassie-Färbung des Gels als Ladekontrolle: Bei der Präparation der DISC-Immunopräzipitation wurde, wie in Abschnitt 2.2.11 dargestellt, vorgegangen. Neben vielen unspezifischen Banden sind bei den Bahnen 5 und 6 sowie 7 und 8 Banden zu sehen, die den CD95-Rezeptor repräsentieren.

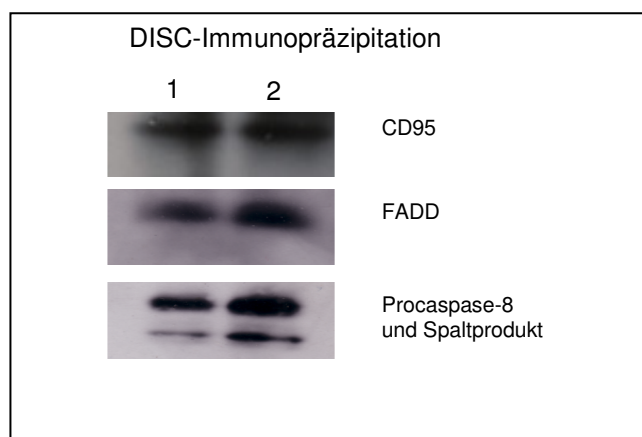


Abbildung 4.8: Vergrößerungen aus den Immuno-Blots: Detektion des CD95-Rezeptors, des FADD-Adaptermoleküls und der Caspase-8 nach DISC-Immunopräzipitation. Es ist keine signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen zu erkennen, in Anbetracht der unterschiedlichen Proteinbeladung.

1: Dünn, + CD95L (für 2h)
 2: Dicht, + CD95L (für 2h)

4.5 Caspase-8 ist in dünn ausgesäten RKO-Kulturen vor und nach CD95L-Inkubation stärker aktiv als in konfluenten Kulturen

Die beiden Kontrollansätze (dicht/dünn ausgesät) ohne CD95L-Behandlung zeigten starke Unterschiede in der Caspase-8-Aktivität. Die dünn- ausgesäten Kulturen zeigten im Vergleich zu den dicht ausgesäten eine hohe Aktivität der Caspase-8 (Mittelwert: 16.647 [SD: ~2.400] im Vergleich zu 9.783 [SD: ~3.000] Fluoreszenzeinheiten [FE]).

Eine Zunahme der Caspase-8-Aktivität in den mit CD95L-inkubierten Zellen war sowohl bei den dünn-ausgesäten wie auch bei den dicht-ausgesäten Kulturen zu beobachten, jedoch erreichten die dünn-ausgesäten Ansätze einen fast doppelte so hohen Wert (Mittelwert: dünn=22.721 [SD: ~4.000] FE; dicht=12.367 [SD: ~2.000] FE).

Bei der relativen Zunahme (CD95L-inkubiert/Kontrolle) zeigten sich jedoch nur geringe Unterschiede, und zwar bei den dünn-ausgesäten eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 1,4, bei den dicht-ausgesäten eine Zunahme um den Faktor 1,3.

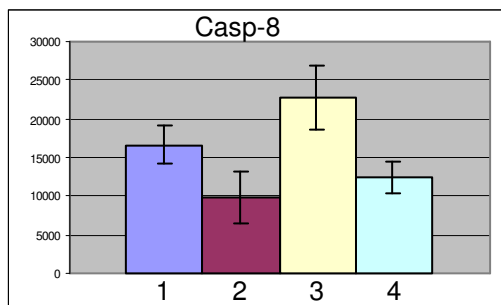


Abbildung 4.9: Diagramm der fluorometrisch ermittelten Caspase-8-Aktivität. Es sind die Ergebnisse von 5 zusammengefassten Einzelmessungen dargestellt.

- 1: Dünn, Kontrolle
- 2: Dicht, Kontrolle
- 3: Dünn, CD95L
- 4: Dicht, CD95L

Zusätzlich durchgeführte Western-Blot-Analysen (siehe Abbildung 4.9) zeigten ebenfalls einen gewissen Unterschied in den beiden Ansätzen und erlauben den Schluss, dass in den dünnen Ansätzen mehr Procaspase in die aktiven Spaltprodukte umgesetzt worden ist.

Die Caspase-8-Aktivitäten, die in dünn ausgesäten, unbehandelten RKO-Zellkulturen gemessen wurden (durchschnittlich 16.647 [SD: ~2.000] FE), überstiegen die Messwerte der CD95L-behandelten dicht ausgesäten Kulturen (durchschnittlich 12.367 [SD: ~2.000] FE). Entsprechendes, nämlich eine höhere Umsetzung von Procaspase-8 in den dünn ausgesäten, unbehandelten RKO-Zellkulturen im Vergleich zu den konfluenten, mit CD95L-behandelten, konnte in der Western-Blot-Analyse beobachtet werden.

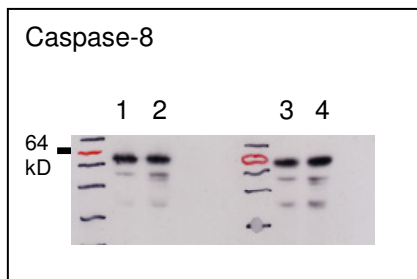


Abbildung 4.10: Anti-Caspase-8 Western-Blot Analyse. Eine vermehrte Umsetzung der Caspase in Lane 3 und 4 (dünn ausgesäte Kulturen) deckt sich mit den Ergebnissen der Caspase-Aktivitäts-Assays.

- 1: Dicht, Kontrolle
- 2: Dicht, CD95L
- 3: Dünn, Kontrolle
- 4: Dünn, CD95L

Hierbei verhielten sich die Caspase-8-Aktivitäten unabhängig von der Apoptoserate, die sich bei den dünn ausgesäten, unbehandelten Zellkulturen in einem subG₁-Anteil von durchschnittlich 3 % und bei den dicht ausgesäten, CD95L-inkubierten Zellkulturen in einem subG₁-Anteil von durchschnittlich 13 % auswirkte.

4.6 In subkonfluenten RKO-Zellkulturen nimmt das mitochondriale Membranpotential nach Inkubation mit CD95L stark ab

Da es sich bei RKO-Zellen um Typ-II-Zellen handelt, ist bei der Death-Receptor-vermittelten Apoptose die Aktivierung des mitochondrialen Pathways essentiell. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP), der dabei auftritt, kann indirekt mit Hilfe des JC-1-Farbstoffes gemessen werden. Die JC-1-Messung und der anschliessende Vergleich des Verhältnisses von der Fluoreszenz im FL-1 zu der im FL-2-Kanal (FL-1/FL-2; siehe Abbildung 4.11) zeigten gewisse Unterschiede zwischen den Kontrollansätzen (Mittelwert: dünn=0,048 [SD: ~0,01]; dicht=0,09 [SD: ~0,07]) und starke Unterschiede zwischen den mit CD95L über 24h inkubierten Ansätzen (Mittelwert: dünn=5,854 [SD: ~2,5]; dicht=0,444 [SD: ~0,1]). In den dünn ausgesäten, CD95L-inkubierten Ansätzen brach das Membranpotential

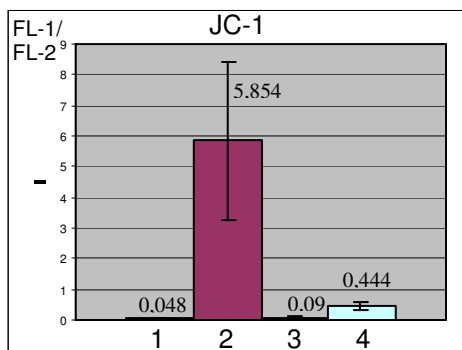


Abbildung 4.11: Diagramm des FL1/FL2-Verhältnis bei JC-1-Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. Gezeigt sind die Durchschnittswerte fünf zusammengefasster FACS-Einzelmessungen.

- 1: Dünn, Kontrolle
- 2: Dünn, CD95L
- 3: Dicht, Kontrolle
- 4: Dicht, CD95L

der Mitochondrien weitgehend zusammen, während dies in den dicht ausgesäten Ansätzen nicht der Fall war.

Diese Ergebnisse decken sich mit den PI-Messungen, die parallel als Kontrolle durchgeführt wurden. Dort zeigt sich bei den dünn ausgesäten CD95L-behandelten Zellen ein durchschnittlicher subG₁-Anteil apoptotischer Zellen von etwa 38 % im Vergleich zu 17 % bei den dicht ausgesäten CD95L-behandelten. Die Kontrollansätze beider Zustände zeigten einen subG₁-Anteil von 3 % (dünn) bzw. 4 % (dicht).

4.7 In dicht ausgesäten Zellen ist eine höhere Konzentration von Bcl-x_L feststellbar

Die Bcl-x_L-Western-Blot-Analyse (siehe Abbildung 4.12) zeigte, dass das anti-apoptotische Bcl-x_L-Protein in den dicht ausgesäten Zellen in erhöhter Menge vorlag. In den mit CD95L inkubierten Ansätzen zeigte sich eine Abnahme der Bcl-x_L-Konzentration sowohl in den dicht als auch in den dünn ausgesäten Zellkulturen im Vergleich zu den Kontrollansätzen, jedoch erscheint die Abnahme in den dichten um einiges geringer als in den dünnen Ansätzen. Da Bcl-x_L ein Substrat der Caspase-8 darstellt, könnte die Abnahme der Proteinkonzentration von Bcl-x_L eine Folge der höheren Caspase-Aktivität sein, die in den Caspase-Assays gezeigt worden ist (siehe Abschnitt 4.5).

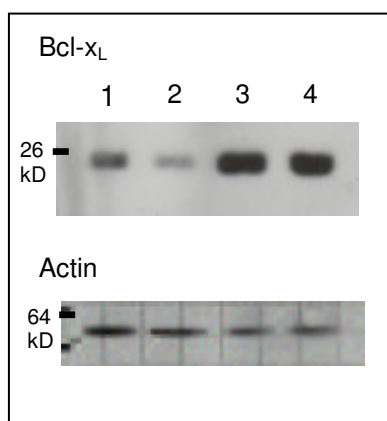


Abbildung 4.12: Immundetektion von Bcl-x_L. Bei gleicher Proteinbeladung (20µg nach Bradford-Proteinbestimmung) zeigt sich eine höhere Konzentration von Bcl-x_L in den dichten Ansätzen (Spur 3 und 4). Ein Actin-WB diente als zusätzliche Ladekontrolle.

- 1: Dünn, Kontrolle
- 2: Dünn, CD95L
- 3: Dicht, Kontrolle
- 4: Dicht, CD95L

4.8 Die Aktivität von Caspase-9 ist in dünn ausgesäten Zellen erhöht

Wie auch bei der Caspase-8-Aktivität (siehe Abschnitt 4.5) zeigte sich bei Caspase-9 ein Unterschied in den Kontrollansätzen ohne CD95L-Inkubation: die dünn ausgesäten Kulturen zeigten eine höhere Aktivität (Mittelwert: 5.345 [SD: ~650] Fluoreszenzeinheiten [FE]) im

Vergleich zu den dicht-ausgesäten (Mittelwert: 3.462 [SD: ~1.100] FE). Ebenfalls zeigte sich eine Erhöhung der Aktivität in den mit CD95L inkubierten Ansätzen (Mittelwert: dünn=12.356 [SD: ~2.600] FE; dicht=6.938 [SD: ~460] FE) mit einer Zunahme der Aktivität um das 2,3-fache bei den dünn-ausgesäten und um das 2-fache bei den dicht-ausgesäten Kulturen (siehe Abbildung 4.13).

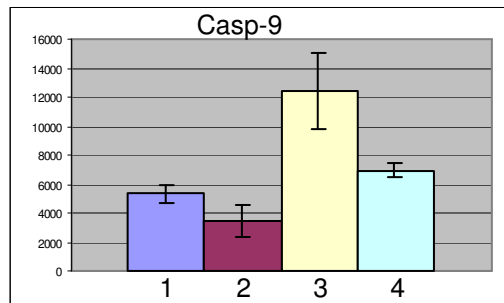


Abbildung 4.13: Diagramm der fluorometrisch ermittelten Caspase-9-Aktivität. Es sind die zusammengefassten Ergebnisse von jeweils 5 Einzelmessungen dargestellt:

- 1: Dünn, Kontrolle
- 2: Dicht, Kontrolle
- 3: Dünn, CD95L
- 4: Dicht, CD95L

4.9 Dünn ausgesäte Zellen zeigen eine stark erhöhte Aktivität von Caspase-3 nach CD95L-Inkubation

Die in den Kontrollansätzen (dicht/dünn ausgesät) gemessene Aktivität der Caspase-3 zeigte nur geringe Unterschiede (Mittelwert: dünn=3.433 [SD: ~420] FE; dicht=2.796 [SD: ~580] FE). Ebenso zeigte sich bei den dünn-ausgesäten, mit CD95L inkubierten Ansätzen erwartungsgemäß eine stark erhöhte Aktivität (Mittelwert: 30.692 [SD: ~1.800] FE) im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Mittelwert: 3.433 [SD: ~420] FE). Auch die dicht ausgesäten CD95L-behandelten Ansätze zeigten eine erhöhte Aktivität (Mittelwert: 17.548 [SD: ~3.000] FE), die allerdings nur etwas mehr als die Hälfte der Werte der dünn ausgesäten Ansätze (Mittelwert: 30.692 [SD: ~1.800] FE) erreichte. Die Zunahme der Aktivität nach Inkubation mit CD95L betrug bei dünn ausgesäten Kulturen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollkultur etwa das 9-fache, während sich bei den dicht-ausgesäten CD95L-inkubierten Ansätzen eine Zunahme um das 6-fache zeigte (siehe Abbildung 4.14).

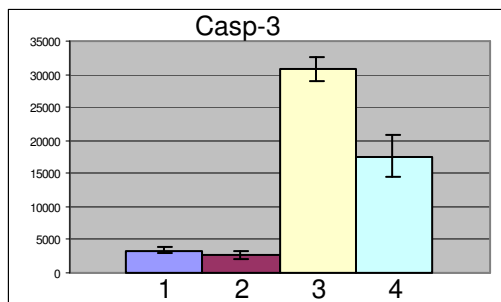


Abbildung 4.14: Diagramm der fluorometrisch ermittelten Caspase-3-Aktivität.

5 zusammengefasste Einzel-messungen.

1: Dünn, Kontrolle

2: Dicht, Kontrolle

3: Dünn, CD95L

4: Dicht, CD95L

4.10 Dicht ausplattierte Zellen exprimieren eine grössere Menge des Zellzyklusinhibitors p27, aber nicht an p21

Um die funktionellen Mechanismen des durch Kontakt-Inhibition verursachten Zellzyklus-Arrests zu untersuchen wurden Western-Blot-Analyse für p21 und p27 durchgeführt. Beide Proteine sind CDK-Inhibitoren, deren Expression zu einem Zellzyklus-Arrest führt (siehe Abschnitt 1.2.6.2.).

4.10.1 p21-Western-Blot

Bei der Beurteilung des p21-Immunoblots fiel auf, dass die Konzentration im dünn-angesäten Kontrollansatz stark erhöht erschien.

Bei den anderen Ansätzen konnte mit der semiquantitativen Western-Blot-Methode kein signifikanter Unterschied der p21-Proteinkonzentration festgestellt werden (siehe Abbildung 4.15).

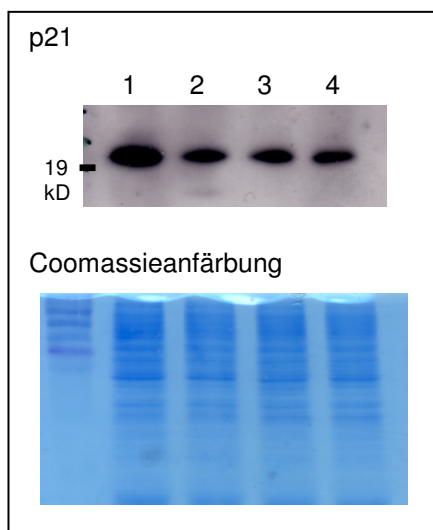


Abbildung 4.15: p21-Western-Blot-Analyse.

Bei gleicher Proteinbeladung zeigt sich eine höhere Konzentration von p21 nur in der dünnen Kontrolle (1) (Proteinbeladung: 10 µg nach Bradford-Proteinbestimmung). Das mit Coomassie gefärbte Gel dient als Ladekontrolle.

1: Dünn, Kontrolle

2: Dünn, CD95L

3: Dicht, Kontrolle

4: Dicht, CD95L

4.10.2 p27 Western-Blot-Analyse

Das Protein p27 zeigte sich deutlich höher reguliert in dicht ausgesäten Ansätzen im Vergleich zu dünneren Kulturen, sowohl in Kontrollen als auch nach CD95L-Inkubation.

Interessanterweise zeigt sich bei den mit CD95L behandelten, dünnen Ansätzen eine Abnahme der p27-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Ansätzen, während dies bei den dicht ausgesäten Zellkulturen nicht der Fall war (siehe Abbildung 4.16)

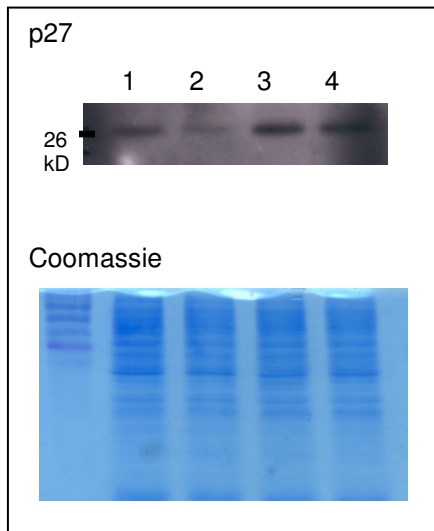


Abbildung 4.16: p27-Western-Blot-Analyse.

In den dünn ausgesäten Ansätzen zeigt sich eine geringere Konzentration des Proteins im Vergleich zu den dichtgewachsenen Kulturen. (Proteinbeladung: 10µg nach Bradford-Proteinbestimmung). Das mit Coomassie gefärbte Gel dient als zusätzliche Lade-Kontrolle.

- 1: Dünn, Kontroll
- 2: Dünn, CD95L
- 3: Dicht, Kontrolle
- 4: Dicht, CD95L

4.11 Micro-Arrays

Um die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (dicht/dünn ausgesät) weiter zu untersuchen wurden Micro-Arrays mit der Absicht durchgeführt, regulierte Gene zu detektieren. Es wurde RNA aus dicht und dünn ausgesäten Zellkulturen verwendet, die unbehandelt belassen wurden.

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA aus den Zellen der verschiedenen Ansätze wurde die Integrität der RNA mit Hilfe eines Agarose-Gels überprüft (siehe Abbildung 3.17).

Danach wurden die Proben benutzt, um nach cRNA-Synthese Affymetrix-Microarrays zu hybridisieren. Diese Arbeit wurde freundlicherweise von Dr. Klein-Hitpass und seinen Mitarbeitern (Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.

Von den etwa 22.000 untersuchten Genen waren mehrere hundert Gene unterschiedlich exprimiert in dicht bzw. dünn ausgesäten Zellkulturen.

Von diesen Genen wurden einige danach ausgewählt und aufgeführt, ob sie nach Literaturdaten für Apoptose oder Proliferation relevant sind.

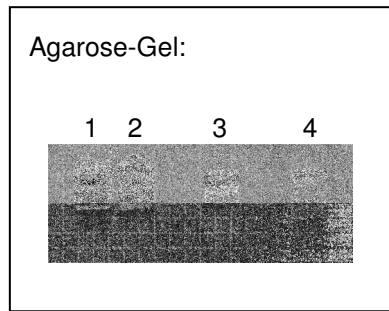


Abbildung 4.17: Ergebnis der RNA-Agarose-Gel-Elektrophorese: Es zeigen sich pro Bahn zwei Banden. Diese entsprechen der 18S- und der 28S-RNA. Die RNA in den Proben kann als intakt angesehen werden (Beladung: 2µg RNA nach OD-Messung).

- 1: Dünn, Kontroll
 2: Dünn, CD95L
 3: Dicht, Kontrolle
 4: Dicht, CD95L

In der folgenden Liste sind einige Gene, die in den dicht ausgesäten Ansätzen hoch- oder herunterreguliert sind, herausgenommen.

Name des Transkripts	Funktion	Regulations-Faktor	PubMed Accession-Nr.	Referenz
Gene, die in dichtgewachsenen Zellkulturen hochreguliert wurden:				
Human IAP-Homolog	Antiapoptotisch, Caspase-Inhibitor	17,51	U37546	
Homo sapiens solute carrier family 2, member 10	Glucose-Transporter	6,28	NM_030777	
Homo sapiens Cdc14B3	CDK-Antagonist	6	AF064105	
Laminin S B3 Kette (LAMB3)	ECM-Protein	4,82	L25541	
Lumican	ECM-Protein	4,44	U21128	
Homo sapiens solute carrier family 21, member 8	Transporter für anorganisch Anionen	3,94	AF187815	
Alpha-2 type IV collagen	ECM-Protein	3,89	M33653	
Homo sapiens programmed cell death 4 (PDCD4)	Tumorsuppressor, proliferationshemmend	3,68	NM_014456	[Goke et al., 2004]
Neuropilin 1	Co-Rezeptor des VEGF-R	3,66	AF016050	[Parikh et al., 2004]

Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3)	Transkriptionsfaktor, stressinduzierbar	3,2	NM_001674	[Jiang et al., 2004]
Homo sapiens apoptosis associated protein (GADD34)	Wachstumsarrest, DNA-Schaden induzierbar	3,18	U83981	
B-cell translocation gene 1	Steuerung der Angiogenese Regulation von Proliferation und Differenzierung, antiproliferativ	3,16	NM_001731	[Iwai et al., 2004]
HMG box containing protein 1	Zellzyklusregulation	3,07	AF019214	
Homo sapiens BCL2-like 1 (Bcl-x _L)	Antiapoptotisch, Bcl2-Protein	3,05	NM_001191	
Cyclin G2	Regulator von p53 (Herrunterregulation), Zellzyklusregulator (antiproliferativ)	2,93	L49506	[Liu et al., 2004]
Homo sapiens B-cell translocation gene 1	Regulation der Angiogenese (antiproliferativ)	2,89	NM_001731	[Iwai et al., 2004]
L-myc	Transkriptionsfaktor (proliferativ, proapoptotisch)	2,79	M19720	
Gelsolin	Seneszenz, antiapoptotisch	2,77	NM_000177	[Ahn et al., 2003]
Homo sapiens enhancer of invasion 10		2,69	AF216381	
Huntingtin interacting protein L		2,64	NM_021980	
Human phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit p110delta	Antiapoptotische Kinase	2,60	NM_005026	
Homo sapiens nuclear factor, interleukin 3		2,60	NM_005384.1	

regulated (NFIL3)				
Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)		2,55	NM_001924	
BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3-like	antiapoptotisch	2,50	AF060922	
Gene, die in dichtgewachsenen Zellkulturen herunterreguliert wurden:				
Serine hydroxymethyltransferase	DNA-Metabolismus, Expression korreliert mit Proliferation	7,41	L23928	[Eichler et al., 1981]
Cyclin B1	Cyclin, verantwortlich u.a. für G2/M-Progression	2,95	BE407516	[Yuan et al., 2004]
Minichromosome maintenance deficient 3 (MCM3)	Zellzyklusregulation, Einleitung der Initiation	2,91	NM_002388	[Schories et al., 2004]
baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	Antiapoptotisches IAP, Zellzyklus-assoziierte Expression	2,85	AB028869	
Homo sapiens heat shock 70kD protein 1B (HSPA1B)		2,79	NM_005346	
cyclin A2	Cyclin, Zellzyklus-Regulation	2,77	NM_001237	
Homo sapiens, replication factor C (activator 1) 5 (36.5kD)	Regulation der Mitose	2,73	BC001866	[Ellison and Stillman, 1998]
Homo sapiens cyclophilin (USA-CYP)	RNA-Splicing u.a. (Target von Cyclosporin A)	2,60	NM_006347	
c-myc binding protein		2,60	D50692	
Homo sapiens Bcl-2-associated	Transkriptionsfaktor, Apoptose und	2,58	AF249273	[Kasof et al., 1999]

transcription factor short form mRNA	Zellzyklusarrest			
Cullin 3		2,53	AU145232	
Tubulin, beta 3		2,51	AA515698	
Homo sapiens heat shock 27kD protein 1 (HSPB1)		2,51	NM_001540	
Homo sapiens kinesin-like 5 (mitotic kinesin-like protein 1) (KNSL5)		2,51	NM_004856	

4.12 Zellzyklus-Profile der Mediumstausch-Versuche

Um den protektiven Effekt weiter zu untersuchen, der bei dicht gewachsenen Zellen beobachtet worden war, wurde die Wirkung des durch dichte Zellen konditionierten Mediums auf die Proliferation und die Apoptose der RKO-Zellen analysiert. Aus der Überlegung heraus, das überstehende Medium dicht ausgesäter RKO-Zellen könnte sich rascher mit sezernierten Wachstumsfaktoren anreichern, wurden Mediumsaustausch-Experimente durchgeführt. Dabei wurde Medium von dicht ausgesäten RKO-Zellkulturen, das über 48h auf den Zellen belassen worden war, vorsichtig abgesaugt, für 15 min. bei 10.000g zentrifugiert und auf dünn ausgesäte RKO-Zellkulturen gegeben. Nach 24h wurden CD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid in den gleichen Konzentrationen wie bei den anderen Versuchen zugefügt.

In Abbildung 4.18 sind die zusammengefassten Ergebnisse von insgesamt 6 unabhängigen Versuchen zu sehen: Ein erhöhter G₁-Anteil von 57 % (SD: ~3 %) bei den mit konditionierten Medium behandelten Kontrollzellen im Vergleich zu dem G₁-Anteil von nur 45 % (SD: ~3,5 %) in den Kontrollzellen, die nicht mit konditioniertem Medium behandelt wurden, zeigt einen G₁-Arrest und eine Verminderung der Proliferation an.

Weiterhin zeigte sich der subG₁-Anteil nach sechsstündiger CD95L-Inkubation bei den Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt worden waren (subG₁= 11 % [SD: ~4,5 %]), im Vergleich zu den Zellen ohne Mediumstausch (subG₁=23 % [SD: ~6 %]) stark erniedrigt.

Das von dichten Zellkulturen abgenommene Medium vermittelt also eine Proliferationshemmung und eine Protektion gegenüber CD95L:

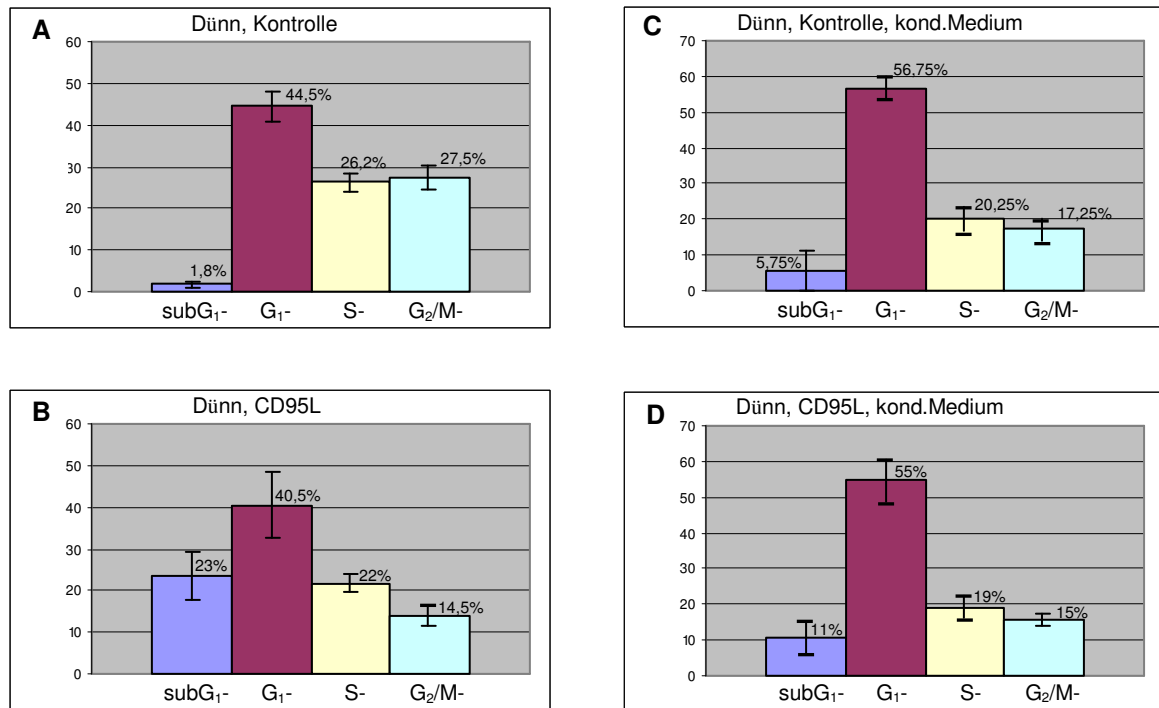


Abbildung 4.18: Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen:

A: dünn ausgesäte Kontrollzellen;

B: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte (6h) Zellen;

C: dünn ausgesäte Kontrollzellen mit konditioniertem Medium für 24h;

D: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte (6h) Zellen mit konditioniertem Medium für 24h;

In den Diagrammen sind die Ergebnisse von 6 Versuchen zusammengefasst. Die durch das konditionierte Medium hervorgerufene Protektion gegenüber einer sechsständigen CD95L-Behandlung ist deutlich zu sehen.

Dünn ausplattierte Zellkulturen, die mit konditioniertem Medium behandelt wurden, zeigten nach 30h (24h Inkubation mit dem konditionierten Medium zuzüglich 6 h CD95L-Inkubation) Zeichen eines G₁-Arrests (Mittelwert: G₁-Phase= 57 %), der mit dem bei dicht ausgesäten Zellkulturen beobachteten Arrest vergleichbar war. Die mit konditioniertem Medium inkubierten Zellen waren gegenüber CD95L-induzierter Apoptose weniger sensitiv (Mittelwert: subG₁=11 %), als die Kontrollzellen (die in diesem Fall einen geringeren subG₁-Anteil zeigten als die unter Abschnitt 4.2.2 dargestellten Versuche; Mittelwert: 23 %) jedoch nicht so gering wie bei dicht ausplattierten Zellen (s.o.). Das Verhältnis der Zellen in der subG₁-Phase der mit CD95L behandelten Kulturen, die in konditioniertem Medium inkubiert worden waren zu denen, die keinen Mediumswechsel erhalten hatten, betrug etwa 2:1

(10,5:23,5), was eine Protektion anzeigt. Die geringere Apoptoserate bei diesen Versuchen liegt wahrscheinlich daran, dass nur für 6h mit CD95L inkubiert wurde im Gegensatz zu 24h bei den in Abschnitt 4.2 beschriebenen Versuchen. Die kürzere CD95L-Inkubationszeit wurde gewählt, um zu verhindern, dass die Zellen wegen Mangelercheinungen oder durch toxische Einfluss absterben, da das konditionierte Medium zum Zeitpunkt des Mediumswechsels schon anfang, sich gelb zu verfärben (pH-Veränderung).

4.13 Weitere Experimente zur Untersuchung des protektiven Effekt

Es wurde durch verschiedene Manipulationen des Mediums versucht, bei dünn ausgesäten RKO-Zellen einen ähnlichen protektiven Effekt hervorzurufen, wie mit konditioniertem Medium beobachtet wurde.

4.13.1 FCS-freies Medium führt zu G₁-Arrest und leicht erhöhter Apoptose

Durch das Weglassen von FCS im Medium der Zellen konnte bei 4 unabhängigen Versuchen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mittelwert: subG₁=23 % [SD: ~6 %]) eine verstärkte Apoptosesensitivität gezeigt werden (Mittelwert: subG₁=42 % [SD: ~12%]). Bei den ohne FCS kultivierten Kontroll-Zellen wurde eine Akkumulation in der G₁-Phase (Mittelwert: G₁=51% [SD: ~6%]) beobachtet. Abbildung 4.19 zeigt die durch PI-Färbung ermittelten Zellzyklus-Profile.

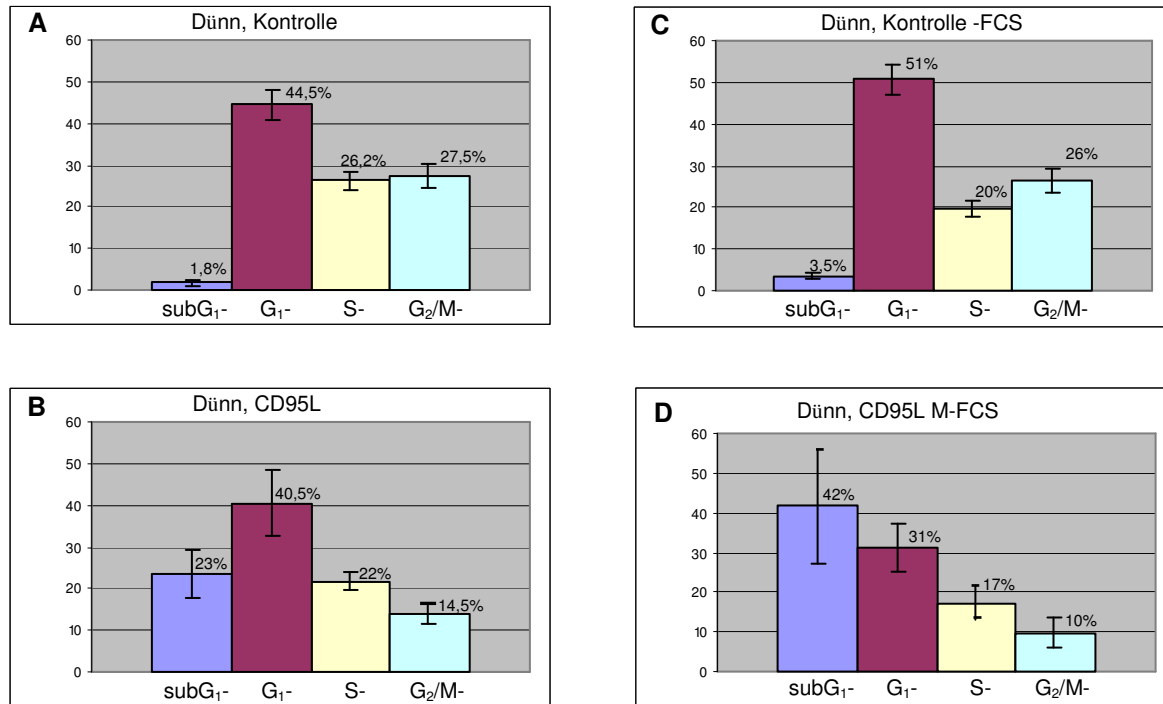


Abbildung 4.19: Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen:

A: dünn ausgesäte Kontrollzellen;

B: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte Zellen;

C: dünn ausgesäte Kontrollzellen, nach 24h Inkubation in serumfreiem Medium;

D: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte Zellen, nach 24h Inkubation in serumfreiem Medium;

In den Diagrammen sind die Ergebnisse von 4 Versuchen zusammengefasst. Durch den FCS-Mangel wird eine erhöhte Apoptoserate bei CD95L-Inkubation (für 6h) hervorgerufen.

4.13.2 Die Erhöhung des FCS-Anteils führt zu keinem deutlichen antiapoptotischen Effekt

Die Zugabe von zusätzlichen 10% frischem FCS zu dem konditionierten Medium führte nicht zu einer deutlichen Veränderung der Apoptose- und Proliferationsrate bei den dünn ausgesäten Zellkulturen. Dieser Versuch wurde nur zweimal durchgeführt, dabei wurden die Ansätze allerdings in Duplikaten angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 zusammengefasst.

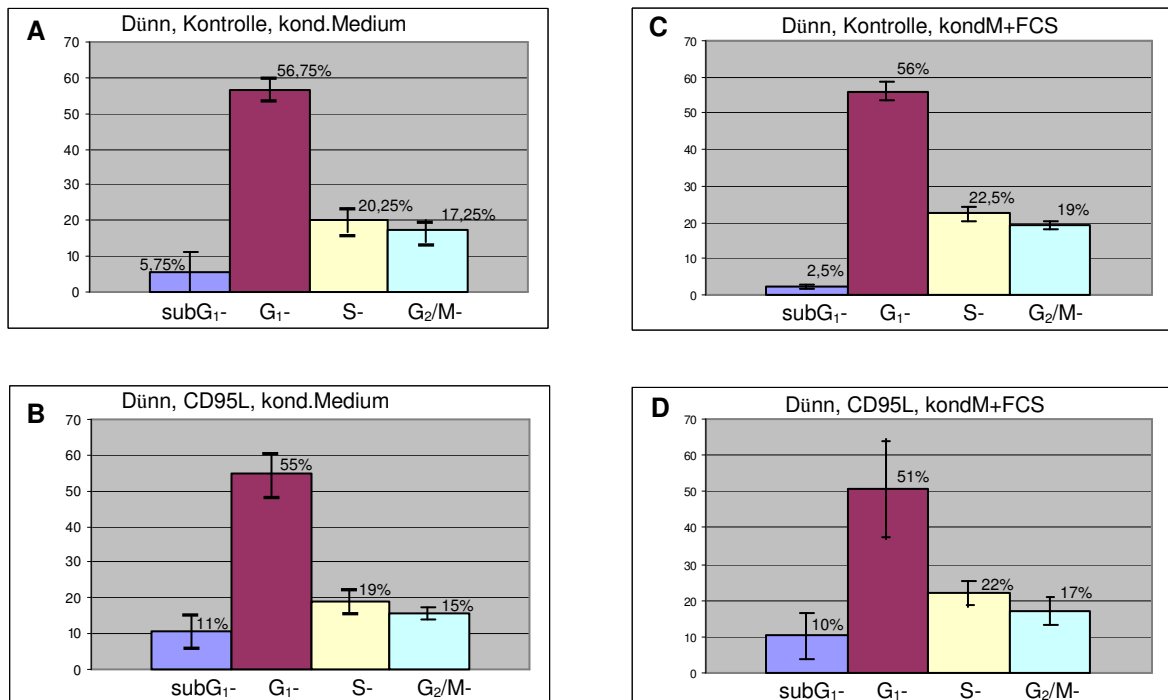


Abbildung 4.20: Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen:

A: dünn ausgesäte Kontrollzellen mit konditioniertem Medium (24h);

B: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte Zellen mit konditioniertem Medium (24h);

C: dünn ausgesäte Kontrollzellen mit konditioniertem Medium + 10 % frischem FCS (24h);

D: dünn ausgesäte, mit CD95L inkubierte Zellen mit kond. Medium und 10% frischem FCS (24h);

In den Diagrammen sind die Ergebnisse von 2 Versuchen mit FCS-Zugabe und die 6 Versuche zu konditioniertem Medium zusammengefasst. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zuständen zu sehen.

5 Diskussion

5.1 Durch Konfluenz und konditioniertes Medium wird bei RKO-Zellen ein protektiver Effekt gegenüber CD95L-induzierter Apoptose vermittelt

In einer grossen Anzahl von Versuchen wurde eine Protektion gegenüber CD95L-induzierter Apoptose in dicht ausgesäten, d.h. konfluent gewachsenen RKO-Kolonkarzinomzellkulturen nachgewiesen. Eine Protektion konnte ebenfalls bei sub-konfluent gewachsenen RKO-Zellen, die in konditioniertem Medium kultiviert wurden, zuverlässig beobachtet werden (siehe Abschnitte 4.2.2 und 4.11). Es zeigte sich eine Reduktion der CD95L-induzierten Apoptose um 50 bis 75% sowohl bei konfluenten als auch bei mit konditioniertem Medium behandelten Zellen im Vergleich zu den subkonfluenten in frischem Medium kultivierten Zellen. So betrug der apoptotische subG₁-Anteil nach CD95L-Inkubation über 24h in den subkonfluenten RKO-Zellkulturen durchschnittlich 45 % (SD: ~11 %), während er bei den konfluent gewachsenen Zellen bei nur 13 % (SD: ~8 %) lag (siehe Abschnitt 4.2.2). Durch Behandlung mit konditioniertem Medium konnte der subG₁-Anteil nach 6h CD95L-Inkubation von durchschnittlich 23 % (SD: ~6 %) auf 11 % (SD: ~4,5 %) gesenkt werden (siehe Abschnitt 4.11). Die Apoptose-Rate in den protektionierten Kulturen (konfluente und in konditioniertem Medium kultivierte) ist also etwa gleich gross, während die dünn ausgesäten, mit CD95L behandelten Kontrollansätze bei der Apoptose-Rate einen starken Unterschied zeigen. Hierbei macht sich offenbar die unterschiedlich lange Inkubationszeit (6h und 24h) bemerkbar. Möglicherweise würde die Apoptose-Rate der durch konditioniertes Medium protektionierten Zellen bei längerer Inkubationszeit ansteigen und die Apoptose-Rate der durch Konfluenz protektionierten Zellen übersteigen, was ein Zeichen dafür wäre, dass die durch konditioniertes Medium verursachte Protektion weniger stark ist. Dieser denkbare Unterschied bei den beiden Arten der Protektion könnte verschiedene Ursachen haben, z.B. könnte die volle Entfaltung des protektiven Effekts mehr Zeit in Anspruch nehmen als nur die 24h dauernde Inkubation mit dem Medium zulässt. Eventuell könnte das konditionierte Medium auch Stress bei den Zellen, die vorher in normalem Medium kultiviert wurden, auslösen. Vergleicht man die relative Abnahme der Apoptose bei beiden Formen der Protektion im Verhältnis zu den jeweiligen subkonfluenten, ungeschützten Kontrollkulturen, so erscheint die Protektion in den mit konditioniertem Medium behandelten Zellen tatsächlich geringer: die relative Apoptose-Rate, d.h. die Apoptose-Rate in den

protektionierten Zellkulturen im Vergleich zur Apoptose-Rate der jeweiligen zugehörigen, mit CD95L inkubierten Kontrollkulturen, vermindert sich bei den durch Konfluenz protektionierten Zellen etwa um den Faktor 6, während sie bei den in konditioniertem Medium kultivierten Zellen nur um den Faktor 4 reduziert ist (bei dieser Berechnung wurden die sub-G₁-Anteile der unbehandelten Zellkulturen von denen der jeweiligen mit CD95L-inkubierten Kulturen abgezogen). Diese Differenz, die aus der weniger stark ausgeprägten Apoptose bei den nicht protektionierten, nur über 6h mit CD95L-inkubierten Kontrollzellen resultiert (bei 6h CD95L-Inkubation zeigte sich hier eine Apoptoserate von 23%, bei einer Inkubation von 24h durchschnittlich 45%) könnte durch die geringere Inkubationsdauer, aber auch durch anti-apoptotische Signale, die durch zusätzliche Zell-Zellkontakte in den konfluenten Kulturen (über Cadherine oder Integrine) vermittelt werden, verursacht sein. Es ist allerdings ebenfalls denkbar, dass die Apoptose-Raten bei den mit konditioniertem Medium behandelten Zellkulturen auch bei einer längeren Inkubationsdauer im Gegensatz zu den Apoptose-Raten bei den mit CD95L-inkubierten Kontrollansätzen nicht weiter steigen und sich daher auch die relative Apoptoserate verändern würde. Von der längeren Inkubationszeit wurde bei den Zellen mit konditioniertem Medium jedoch abgesehen, da hinzutretende cytotoxische Effekte durch das verbrauchte Medium nach längerer Kultivierung befürchtet wurden.

Der protektive Effekt ist bei den beiden Kulturbedingungen (konfluente und in konditioniertem Medium kultivierte Zellkulturen) trotzdem zu sehen, und es kann hierbei davon ausgegangen werden, dass diese Protektion gegenüber CD95L-induzierter Apoptose bei konfluenten und bei in konditioniertem Medium kultivierten RKO-Zellkulturen auf gleichen Ursachen beruht. So geht die Protektion sowohl bei den konfluenten als auch bei den mit konditioniertem Medium behandelten Zellkulturen mit einer Steigerung der Zellanteile in der G₁-Phase und einer entsprechenden Reduktion sowohl in der S- als auch in der G₂M-Phase im PI-Zellzyklus-Profil einher, als Zeichen eines unvollständigen G₁-Arrests mit reduzierter Proliferation (s. Abschnitt 4.2.1 und 4.12). Der mögliche Zusammenhang von Proliferation und Protektion wird weiter unten ausführlicher diskutiert (Abschnitt 5.3.1).

Prinzipiell kann eine Protektion entweder auf einer Reduktion der pro-apoptotischen oder aber auf einer Steigerung der anti-apoptotischen Einflüsse auf die Zelle zurückzuführen sein. Es handelt sich bei dem protektiven Effekt, analog zum „Wippen-Modell“ der Apoptose (siehe Abbildung 1.3 in Abschnitt 1.1.1), um eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die anti-apoptotische Seite. Diese Verschiebung kann eine Reihe von Ursachen haben:

1. Reduktion des intrazellulären Gehalts an pro-apoptotischen Molekülen, entweder durch Beeinflussung der Gen-Expression oder durch beschleunigten/verstärkten Abbau (z.B. Ubiquitin-vermittelt [Dohi et al., 2004])
2. Steigerung des intrazellulären Gehalts an anti-apoptotischen Molekülen, entweder durch Beeinflussung der Gen-Expression oder durch Hemmung des Abbaus
3. Steigerung der Effektivität anti-apoptotischer Moleküle, z.B. durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder Umverteilung von einem zellulären Kompartiment in ein anderes (z.B. Phosphorylierung von Akt [Partovian and Simons, 2004])
4. Hemmung der Effektivität pro-apoptotischer Moleküle durch ähnliche Mechanismen wie unter 3. beschrieben (z.B. Freisetzung von DIABLO aus dem Mitochondrium [Ekert et al., 2001], Freisetzung von Bim aus Mikrotubuli-Komplexen [Antonsson, 2001])

Hinzu kommt die Möglichkeit, dass die Zellen sekundär anti-apoptotisch wirksame Substanzen in das Medium sezernieren, z.B. eine lösliche Form des CD95-Rezeptor, der freien CD95L aus dem Medium eliminieren könnte oder auch bestimmte Proteasen, die zur Spaltung des CD95L oder CD95-Rezeptor beitragen könnten. Auf diese Möglichkeiten wird weiter unten noch eingegangen (siehe Abschnitt 5.3), vorher sollen jedoch Probleme, die sich bei bestimmten Versuchsanordnungen und bei der Interpretation der Ergebnisse ergaben, diskutiert werden.

5.2 Probleme bei Versuchsanordnung und Interpretation der Ergebnisse

In Bezug auf die Ergebnisse sind einige methodische Probleme bei den Versuchsanordnungen im Laufe der Promotionsarbeit auffällig geworden. Ein Problem, das die Vergleichbarkeit der CD95L-Sensibilitäten von dicht und dünn ausgesäten Zellen betrifft, ist das unterschiedliche Verhältnis von Zellzahlen zur Menge an CD95L bei den verwendeten Kulturbedingungen. Es wurden sowohl bei den dünn ausgesäten als auch bei den dicht ausgesäten Zellkulturen die gleiche Konzentration von CD95L (10 ng/ml) bei gleichem Volumen an Medium verwendet. Daraus ergibt sich bei den beiden Ansätzen ein unterschiedliches Verhältnis von Zellzahl (d.h. einer bestimmten Menge an CD95-Rezeptor-Molekülen) zu CD95L-Molekülen, was nur unter der Annahme tolerierbar ist, dass sich CD95L konzentrationsabhängig wie ein Toxin verhält,

bzw. in starkem Überschuss vorliegt und einer Reaktion 1.Ordnung folgend wirkt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass in dichten Zellkulturen die einzelnen Zellen einen geringeren apoptotischen Stimulus erhalten, da sich ja die vorhandene Menge an CD95L auf eine grössere Anzahl CD95-Rezeptoren verteilt. Bei den dicht und dünn ausgesäte Kulturen vergleichenden Versuchen könnte also der protektive Effekt in konfluenten Schalen theoretisch allein durch die Verteilung von CD95L auf mehr Zellen und die schnellere Elimination durch Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes bedingt sein. Die Versuche, bei denen dünn ausgesäte Zellen mit und ohne Kultivierung in konditioniertem Medium verglichen worden waren, zeigten jedoch, dass das konditionierte Medium selbst schon dazu fähig ist, eine Protektion bei den Zellen auszulösen, ohne dass grössere Unterschiede zu der Protektion bei konfluenten Zellen zu sehen gewesen wären. Dies spricht dafür, dass die Protektion auch in den dicht ausgesäten Zellkulturen nicht oder nicht nur auf dem veränderten CD95L/Zellen-Verhältnis beruht. Hierfür spricht auch das Vorhandensein von intrazellulären Veränderungen in den konfluenten Zellen, die für eine erhöhte Apoptose-Resistenz verantwortlich sein könnten (z.B. erhöhte Bcl-x_L-Expression).

Ein anderes Problem ist, dass zur Untersuchung des protektiven Effekt bei den in konditioniertem Medium kultivierten Zellkulturen nur PI-Zellzyklus-Messungen vorliegen. Sämtliche weitere Untersuchungen wie Western-Blot-Analysen, Caspase-Assays usw. sind nur bei dicht ausgesäten Zellen angewendet worden (siehe Ergebnisteil). Die Ähnlichkeit in den Zellzyklus-Profilen der protektiven Effekte bei den beiden verschiedenen Ansätzen erscheint jedoch so gross, dass sie als gleichartig angenommen wurden. Die Protektion bei konfluenten und bei mit konditioniertem Medium behandelten Zellen wird also als durch identische Mechanismen verursacht angenommen, und es wird davon ausgegangen, dass die Ergebnisse, die bei konfluenten Zellen gewonnen wurden, auch für die mit konditioniertem Medium behandelten Zellen gelten.

Ein Problem bei der Interpretation der Apoptose-Sensitivität in Abhängigkeit von der Proliferation ergibt sich aus dem Umstand, dass die CD95L-inkubierten Zellkulturen zusammen mit den Kontroll-Zellkulturen zur gleichen Zeit geerntet wurden (also 6h bzw. 24h nach Zugabe des CD95L). Dies bedeutet, dass nur indirekt Aussagen über den Proliferationszustand der Zellkulturen zum Zeitpunkt der CD95L-Zugabe gemacht werden können. Beim Vergleich der Zellzyklus-Profile der Kontrollzellen der verschiedenen Versuche fällt jedoch auf, dass nur geringe Unterschiede zwischen den Kontrollzellen der Mediums-Versuche und denen der Konfluenz-Versuche feststellbar sind. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Zellzyklus-Profile der Kontrollzellen zumindest bei den

Versuchen mit dicht ausgesäten Zellen die Proliferationsaktivität zum Zeitpunkt der CD95L-Zugabe wiedergeben (s. Abschnitte 4.2.2 und 4.11).

5.3 Charakterisierung des protektiven Effektes

Es kann als gesichert angesehen werden, dass der protektive Effekt sowohl bei dicht ausgesäten als auch bei den mit konditioniertem Medium behandelten Zellkulturen in erster Linie durch eine bestimmte Eigenschaft des Mediums hervorgerufen wird. Es ist unmöglich, dass dieser Effekt und der einhergehende G₁-Arrest allein durch über Zellkontakte (über Cadherine oder Integrine) vermittelte Signaltransduktion ausgelöst wird. Zell-Zellkontakte sind bei den mit konditioniertem Medium behandelten Zellen im Gegensatz zu den dicht ausgesäten in viel geringerem Maße vorhanden, in Bezug auf die Zellzyklus-Profile und Apoptose-Rate unterscheiden sie sich jedoch nur wenig. So liegt der sub-G₁-Anteil bei dicht ausgesäten Zellen bei 5 % (Kontrollzellen) bzw. 13 % (+CD95L), bei den dünn ausgesäten, mit konditioniertem Medium behandelten Zellen bei 5 % (Kontrollzellen) bzw. 11 % (+CD95L). Auch bei den Zellanteilen in den Zellzyklusphasen G₁, S und G₂M sind die Unterschiede marginal (siehe Abschnitte 4.2.2 und 4.11). Hinzu kommt noch, dass der Unterschied in der relativen Apoptoserate (Faktor 6 im Vergleich zu Faktor 4, s.o.) schwer zu interpretieren ist. Es bleibt nämlich ungewiss, wie sich die Apoptose-Rate der mit konditioniertem Medium behandelten Zellen bei längerer Inkubationszeit noch entwickeln würde. So könnte die relative Apoptose-Rate sich bei einer längeren Inkubationszeit bei beiden Ansätzen angleichen (durch den raschen Wechsel des Mediums könnte auch ein pro-apoptotischer Reiz ausgelöst werden). Unzweifelhaft ist jedoch, dass ein protektiver Effekt bei dünn ausgesäten Zellen durch konditioniertes Medium ausgelöst werden kann.

Durch konditionierte Medien hervorgerufene anti-apoptotische Effekte sind in der Literatur bei einer Vielzahl verschiedener Zellarten und Zelllinien beschrieben worden. So zeigten Mena et al. und Watanabe et al., dass mit durch bestimmte Zellen (Glia- bzw. Microgliazellen) konditioniertes Medium die Apoptosesensitivität von kultivierten Neuronen, die mit Apoptose-induzierenden Agenzien behandelt werden, reduziert werden kann. Durch Moreno et al. konnte die Apoptose-hemmende Wirkung von IL-6, das von Endothelzellen ins Medium sezerniert wurde, auf Leukämiezellen nachgewiesen werden [Mena et al., 1999; Moreno et al., 2001; Watanabe et al., 2000]. Die in einer Arbeit von Tokudome et al. dargestellte Beeinflussung der Sensibilität von Kardiomyocyten gegenüber Doxorubicin durch von kardialen Mesenchymzellen gebildetem Endothelin-1 verdeutlicht die Bedeutung,

die solche Effekte auch physiologisch *in vivo* in einem bestimmten Organ oder Gewebe haben können [Tokudome et al., 2004]. Auch gibt es einige Arbeiten, bei denen Faktoren identifiziert wurden, die von etablierten, auf Tumoren zurückgehenden Zelllinien autokrin sezerniert wurden. Z.B. zeigten Pouliot et al. in verschiedenen Arbeiten, dass Kolonkarzinomzellen eine Reihe von Faktoren (EGF, TGF- α und Laminin) sezernieren, die sich teilweise gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken, d.h. synergistisch wirken, sich teilweise jedoch auch gegenseitig bedingen in ihrer Wirkung auf das Migrationsverhalten, die Proliferation und die Apoptose-Sensitivität [Pouliot and Burgess, 2000; Pouliot et al., 2000]. Die genannten Faktoren führten kombiniert zu einem verstärkten Migrationsverhalten, einer gesteigerten Proliferation und einer reduzierten Apoptose-Sensitivität. Der anti-apoptotischen Effekte ging hierbei im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit behandelten Effekt, bei dem ein G₁-Arrest beobachtet werden konnte, mit einer Steigerung der Proliferation einher (siehe Abschnitt 4.2). Bei dem hypothetischen Faktor, der dem im Rahmen dieser Promotionsarbeit beobachteten anti-apoptotischen Effekt zugrunde liegt, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um sezernierten oder proteolytisch abgespaltenen, löslichen CD95-Rezeptor, der den ins Medium gegebene CD95L binden und damit neutralisieren könnte, da in den protektionierten Zellkulturen auch intrazelluläre Korrelate der Protektion zu finden sind (Bcl-x_L-Hochregulation).

Es erscheint nahe liegend, dass es sich bei der Ursache für den protektiven Effekt um einen oder mehrere in das Medium sezernierte Überlebens-Faktoren handelt, die sich anti-apoptotisch und die Migration fördernd - wie Versuche zum Migrationsverhalten zeigten, die von Dr. Oehme in der Forschungsgruppe Zörnig durchgeführt worden sind (s.u.) - auswirken, jedoch nicht zu einer Steigerung der Proliferation führen. In ihrer Promotionsarbeit verwendete Dr. Oehme einen auf einer Polycarbonatmembran basierenden Migrations-Assay, bei dem das konditionierte Medium verstärkte Migration durch die Membran verursachte.

Durch ein Zytokin-Detektions-Arrays, das Dr. Oehme im Rahmen ihrer Promotionsarbeit ebenfalls einsetzte, konnten von den vielen untersuchten Zytokinen (siehe Liste im Anhang) folgende im konditionierten Medium als höher konzentriert identifiziert werden:

- Angiogenin
- IL-8
- IGFBP-2
- LIF
- PIGF

Keines der untersuchten Zytokine konnte jedoch zweifelsfrei als für den protektiven Effekt verantwortlich identifiziert werden. Nebenbei gelten die aufgeführten Zytokine nicht als anti-proliferativ. TGF- β , das sich auch anti-proliferativ auf Zellkulturen auswirken kann [Ravitz and Wenner, 1997] wurde im Arrayexperiment nicht als erhöht im Medium angezeigt.

Als mögliche autokrin sezernierte Faktoren kommen auch Glucocorticoide und andere Faktoren, die nicht durch den Zytokin-Array erfasst wurden, in Frage. Für die Glucocorticoide sind sowohl anti-apoptotische als auch anti-proliferative Effekte beschrieben [Herr et al., 2003].

Durch verschiedene Experimente konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass der anti-apoptotische Effekt durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren oder bestimmten anderen Substanzen im verbrauchten Medium hervorgerufen wird. Hierzu wurden Versuche mit Medium gemacht, dem kein FCS, Glutamin oder Glucose zugefügt worden war (siehe Abschnitt 4.13 - Ergebnisse nur teilweise gezeigt). Bei den Versuchen mit FCS-freiem Medium zeigte sich wie bei konfluenten Zellen oder Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt worden waren, eine Akkumulation der Zellen in der G₁-Phase, jedoch keine Reduktion, sondern eine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollkulturen - ein Ergebnis, das dagegen spricht, dass verringerte Proliferation direkt zu einer erhöhten Apoptose-Resistenz führt. Der G₁-Arrest ist hier vielleicht sogar als Schutz-Reaktion der Tumorzellen auf die fehlenden Wachstumsfaktoren und die damit einhergehende erhöhte Apoptose-Sensitivität anzusehen. Das heisst, der G₁-Arrest könnte ein zellulärer Mechanismus sein, mittels dessen sich die Zelle vor pro-apoptotischen Reizen gewisser Intensität bzw. in Apoptose-begünstigenden Situationen schützen kann. Interessanterweise ist eine gewisse Abhängigkeit der Apoptoserate vom G₁-Arrest, bzw. dem Anteil der Zellen in der M- und G₂-Phase als Zeichen der Proliferation, bei den verschiedenen Versuchen in der Form zu sehen, dass die Zellkulturen tendenziell umso weniger Apoptose zeigen, je weniger Proliferation in den Kontrollansätzen vorhanden ist. Es kann hierbei aber nur von einer Tendenz gesprochen werden, die sich bei dicht ausgesäten Kulturen zeigt, die einen besonders ausgeprägten G₁-Arrest aufweisen, während die Apoptoseraten inter-experimentell jedoch so stark variieren, dass eine Korrelation nicht postuliert werden kann. Diese inter-experimentellen Unterschiede sind vermutlich auf Ungenauigkeiten bei der Substanzzubereitung und den eingesetzten Volumina an Medium, auf Pipettier- und Messfehler zurückzuführen.

In zukünftigen Experimenten sollte zuerst der Versuch gemacht werden, den Kreis der für den protektiven Effekt möglicherweise verantwortlichen Faktoren einzuengen. Dies könnte durch

weitere Zytokin-Arrays geschehen, oder auch durch biochemische Methoden (z.B. HPLC-Bestimmung des Gehaltes an Glucocorticoiden oder ähnlichen Hormonen im Medium, Aufreinigung von Proteinen und massenspektrometrische Identifizierung). Als weitere Schritte wäre es möglich, durch Verwendung von neutralisierenden Antikörpern - gegen die Zytokin-Rezeptoren gerichtet - diese Ergebnisse zu verifizieren.

Ein weiterer Ansatz wäre es, den in Frage kommenden Faktor isoliert zu dünn ausgesäten Zellen hinzuzugeben und zu überprüfen, ob dies den protektiven Effekt mit all seinen Charakteristika hervorrufen würde - besonders der ungeklärte Zusammenhang von G₁-Arrest und Apoptose könnte so vielleicht erhellt werden.

Von einem anti-apoptotischen, autokrin sezernierten Faktor (es könnte sich dabei wie bei den Versuchen von Pouliot et al. auch um eine Kombination verschiedener, sezernierter Substanzen handeln) würden die Krebszellen auch *in vivo* auf verschiedene Weise profitieren. So wäre die Protektion gegenüber CD95L-induzierter Apoptose ein idealer Schutz gegen cytotoxische T-Zellen, die unter normalen Bedingungen über Granzyme B und Death-Receptor-induzierte Apoptose Krebszellen eliminieren. Angesichts der anti-apoptotischen Regulation (z.B. gesteigerte Expression von Bcl-x_L, reduzierte Caspase-Aktivität) kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen auch gegen andere Apoptose-auslösende Reize (z.B. verschiedene Chemotherapeutika) resistenter würden. Die Sekretion eines autokrinen Faktors könnte den Tumorzellen weiterhin eine gewisse Autonomie von sie umgebenden, Überlebensfaktor-bildenden Stromazellen verleihen, und damit auch eine Voraussetzung für Metastasierung darstellen. Der in der Arbeit von Dr. Oehme dargestellte Einfluss des Faktors auf die Migration könnte ebenfalls zu einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit führen.

5.3.1 Der protektive Effekt geht mit einer Reduktion der Proliferation einher, die durch p27 verursacht sein könnte

Anfänglich war angenommen worden, dass die in Abschnitt 4.2.1 beschriebene Akkumulation der dicht ausgesäten RKO-Zellen in der G₁-Phase durch Kontakt-Inhibition verursacht wäre. Diese Annahme wurde durch das Vorhandensein eines entsprechend ausgeprägten G₁-Arrests bei den Zellen, die in konditioniertem Medium kultiviert wurden, relativiert.

Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kontakt-Inhibition eine Rolle spielt (s. Abschnitt 4.11). Als mögliche Ursachen des G₁-Arrests bei den dünn ausgesäten und mit konditioniertem Medium behandelten Zellen kommen einerseits eine Akkumulation von Stoffwechselendprodukten bzw. der Mangel bestimmter notwendiger Substanzen, oder

andererseits auch ein autokriner, anti-proliferativer Faktor (der u.U. auch für den protektiven Effekt verantwortlich ist) in Frage.

Ein Mangel an bestimmten Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen als Ursache für den G₁-Arrest konnte durch die unter Abschnitt 4.13 beschriebenen Versuche, bei denen FCS (enthält Wachstumsfaktoren), Glucose und/oder Glutamin zu dem konditioniertem Medium zugegeben wurden, für die jeweiligen Substanzen ausgeschlossen werden - es ergaben sich hierdurch keine Änderungen des Apoptose- oder Proliferationsverhaltens. Beim Weglassen von FCS im Medium zeigte sich ein gewisser G₁-Arrest, der jedoch mit gesteigerter Apoptose einherging (s.o.).

Dass die geringere Sensibilität gegenüber CD95L sowohl in den dicht ausgesäten RKO-Zellen, als auch in denen, die mit konditioniertem Medium behandelt worden waren, mit einer Proliferationshemmung einhergeht, könnte jedoch trotzdem für eine prinzipielle Koppelung der Apoptose mit der Proliferation sprechen, wie sie in zahlreichen Publikationen beschrieben wird (siehe Abschnitt 1.3).

Als Mediator des beobachteten G₁-Arrest kommt die erhöhte Expression von p27 in Frage, ein Protein, das vielfach für den durch Kontaktinhibition verursachten G₁-Arrest verantwortlich gemacht wurde (s. Abschnitt 1.2.6.2). Die erhöhte p27-Konzentration in dicht ausgesäten Zellen konnte zuverlässig nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.9.2) - im Falle der subkonfluenten mit konditioniertem Medium behandelten Zellen wurde dies nicht überprüft, es kann aber davon ausgegangen werden, dass sich hier ebenfalls die intrazelluläre p27-Konzentration für den beobachteten G₁-Arrest verantwortlich ist.

Als klassischer CDK-Inhibitor wird p27 eher eine pro-apoptotische Wirkung zugesprochen (s. Abschnitt 1.2.6.2 und [Katayose et al., 1997; Supriatno et al., 2002]), es sind jedoch auch Beispiele in der Literatur bekannt, bei denen sich p27 anti-apoptotisch auswirkt. Z.B. zeigten Drexler et al., dass die erhöhte Expression von induzierbarem p27 die Apoptose-Sensibilität bestimmter Zellen reduzieren kann [Drexler and Pebler, 2003]. Genau wie im Falle der vorliegenden Arbeit beobachtet, geht bei Drexler et al. die Senkung der Apoptose-Sensibilität mit einer reduzierten Proliferation einher. Es bleibt bei Drexler et al. ungeklärt, ob die Protektion hierbei direkt auf die Reduktion der Proliferation zurückzuführen ist, oder es noch zusätzliche Mediatoren der Protektion notwendig sind, die eventuell durch p27 induziert werden.

Bei den konfluenten RKO-Zellkulturen zeigte sich Bcl-x_L - als ein klar anti-apoptotisches Protein - hochreguliert (siehe Abschnitt 1.1.6.1 und 4.7). Wie in der Literatur gezeigt wurde, könnte die erhöhte p27-Expression sogar durch Bcl-x_L verursacht sein [Greider et al., 2002].

Dies könnte auf einen genetischen Schutzmechanismus gegen Entartung zurückzuführen sein, der die erhöhte Apoptose-Resistenz, die durch Bcl-x_L ermöglicht wird, mit einer verminderten Proliferation koppelt.

Interessanterweise verhält sich die Expression von p21 bei den durch Konfluenz protektionierten RKO-Zellen gegensätzlich zur Expression von p27. Eine vergleichbare gegensätzliche Regulation von p27 und p21 wurde auch durch Yanagisawa et al. bei durch Kontaktinhibition arretierten Zellen beobachtet [Yanagisawa et al., 1999]. Über die Hintergründe dieses Phänomens kann jedoch nur spekuliert werden. Da p21 auch als pro-apoptotisches Protein beschrieben worden ist, könnte seine Herunterregulation einen Anteil an der Protektion haben [Wu et al., 2002]. Auch könnte die gegensätzliche Regulation von p21 und p27 bei den durch Konfluenz geschützten Zellen Ausdruck einer insgesamt anti-apoptotischen Genregulation sein, die durch einen autokrin sezernierten Faktor verursacht sein könnte.

Um dies mit Bestimmtheit sagen zu können, müsste die Auswirkung von singular hoch- und herunterreguliertem p21 und p27 in weiteren Versuchen mit RKO-Zellen näher untersucht werden.

Die sowohl bei Konfluenz, als auch bei Inkubation mit konditioniertem Medium beobachtete relative Reduktion der Zellanteile in S- und G₂M-Phase als Ausdruck der reduzierten Proliferation könnte auch - unabhängig von der reduzierten Apoptose-Sensitivität - ein Überlebensvorteil für einzelne Tumorzellen sein. So könnten Tumorzellen, die durch bestimmte Einflüsse wie z.B. Nährstoffmangel oder Akkumulation von bestimmten Faktoren (z.B. Stoffwechselendprodukten) in ihrer Proliferation gehemmt werden, in grösseren, soliden Tumoren bessere Überlebenschancen haben, indem sie ihre Proliferationsverhalten der Vaskularisation, d.h. dem Angebot an Nährstoffen, anpassen. Diese Tumorzellen könnten so selektioniert werden. Umgekehrt spricht die Tatsache, dass in soliden Tumoren regelmässig Nekrosen (v.a. bei grösseren Tumoren) vorkommen, dafür, dass bestimmte ungehemmt proliferierende Tumorzell-Klone unter Umständen einen Überlebensnachteil haben.

Theoretisch wäre also eine Reduktion der Proliferation *in vivo* als Überlebensvorteil für die Tumorzellen denkbar, indem in der vorhandenen Tumormasse bei knapp werdenden Nährstoffen (bedingt durch die dem Tumorstadium nicht nachkommende Durchblutung), die Proliferation gedrosselt und so der durch Angiogenese-Faktoren eingeleitete Vaskularisation die Möglichkeit gegeben würde, nachzukommen.

Als weitere Ursache für die Selektion von Zellklonen mit geringerer Proliferationsrate bzw. mit temporärem Proliferationsstopp könnte auch eine Therapie mit bestimmten Chemotherapeutika, die vor allem auf proliferierende Zellen wirken, in Frage kommen.

Die Sekretion eines anti-proliferativen Faktors könnte sich für das Überleben der Tumorzellen auch positiv auswirken, wenn dadurch das Immunsystem supprimiert würde, wie es häufig bei Tumor-Patienten beobachtet werden kann.

Schlussendlich bleibt jedoch unklar, ob der mit der Protektion auftretende G₁-Arrest ursächlich an der Entstehung des protektiven Effektes beteiligt ist, oder nur eine Begleiterscheinung, die z.B. durch Wachstumsfaktor-Depletion des Mediums oder Stoffwechselendprodukt-Akkumulation verursacht sein könnte (siehe Abschnitt 4.2).

5.3.2 Bcl-x_L-Expression und Caspasen-Suppression bei durch Konfluenz protektionierten Zellen

Die unter Abschnitt 4.7 beschriebenen Unterschiede der Bcl-x_L-Konzentrationen lassen sich gut mit den Ergebnissen der PI-FACS-Messungen, die eine reduzierte, mit einem G₁-Arrest einhergehende Apoptose-Sensitivität zeigten (siehe Abschnitt 4.2.2), vereinbaren.

Bcl-x_L als Mitglied der anti-apoptotischen Bcl-2-Subfamilie vermag es, bei Überexpression die intrinsische Apoptose-Kaskade zu hemmen und so in Typ-II-Zellen die durch Todesrezeptoren ausgelöste Apoptose zu unterdrücken (siehe Abschnitt 1.3 [Chao et al., 1995; Scaffidi et al., 1999b]).

Es kann hierbei davon ausgegangen werden, dass dies ein konzentrationsabhängiger Effekt ist, d.h., dass eine Steigerung der intrazellulären Konzentration von Bcl-x_L auch mit einer stärkeren Protektion gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli einhergeht, da die anti-apoptotische Wirkung durch Bindung und Neutralisierung pro-apoptotischer Bcl-2-Familienmitgliedern (zusätzlich auch von Cytochrom c und Caspasen [Brustugun et al., 1998]) entsteht (siehe Abschnitt 1.1.6.1).

Beim Vergleich der dünn mit den dicht ausgesäten Kontrollansätze bei dem in Abbildung 4.10 dargestellten Bcl-x_L-Western-Blot fällt bei identischer Proteinbeladung eine weitaus höhere Bcl-x_L-Konzentration bei den konfluenten Zellen auf.

Weiterhin fällt auf, dass die Inkubation mit CD95L zu einer Reduktion der Bcl-x_L-Menge führt, und dass diese Reduktion in den subkonfluenten Zellen um einiges stärker ausgeprägt ist als in den konfluenten. Daraus kann man schliessen, dass Bcl-x_L bei RKO-Zellen während

der Apoptose (wahrscheinlich durch Caspasen) abgebaut wird [Clem et al., 1998], und dass dies bei den subkonfluenten Kulturen in stärkerem Maße stattfindet.

Bcl-x_L könnte auch für die Reduktion der Proliferation verantwortlich sein. Wie durch Janumyan et al. gezeigt wurde, verstärkt Bcl-x_L das Ausmass eines G₁- und G₀-Arrests [Janumyan et al., 2003]. Dieses Ergebnis spricht für das postulierte Sicherheitssystem, welches Proliferation mit Apoptose verbindet (siehe Abschnitt 1.3). Der G₁-Arrest wird hier mit grosser Wahrscheinlichkeit hauptsächlich durch p27, das durch Bcl-x_L induziert sein könnte, ausgelöst (siehe Abschnitt 5.3.1; [Greider et al., 2002]).

Die erhöhten Bcl-x_L-Konzentrationen könnten auch zur Erklärung der vergleichsweise niedrigen Caspase-8-Aktivität in den dicht ausgesäten, unbehandelten RKO-Zellen dienen (s. Abschnitt 4.5). Durch Stegh et al. wurde gezeigt, dass aktivierte Caspase-8 durch Bcl-x_L und dem mitochondrialen Protein BAR (bifunctional apoptosis regulator) in einem Komplex gebunden und inaktiviert werden kann [Stegh et al., 2002]. Es ist nicht auszuschliessen, dass sich dies trotz denaturierender Bedingungen auch in den Caspase-Assays auswirkt. Die gehemmte Caspase-8-Aktivierung würde auch zu einer geringeren Aktivierung von Caspase-9 führen, wie sie bei den konfluenten Zellen beobachtet wurde (s. Abschnitt 4.8). Wie in Abschnitt 4.5 dargestellt, zeigt sich in den dünn ausgesäten Kontrollzellen eine relativ hohe Caspase-8-Aktivität von durchschnittlich 16.647 FE. Im Vergleich dazu erscheint die Caspase-8-Aktivität der dicht ausgesäten, CD95L-inkubierten Zellen von durchschnittlich 12.367 FE niedrig, vor allem angesichts der Tatsache, dass hierbei Caspase-8-Aktivität und Apoptoserate nicht korrelieren. So beträgt der subG₁-Anteil bei den dünn ausgesäten Kontrollzellen 3 % (Caspase-Aktivität: 16.647 FE), bei den dicht ausgesäten und mit CD95L-inkubierten Zellen jedoch 13 % (12.367 FE). Bei den Messungen der Caspase-9-Aktivität (siehe Abschnitt 4.8) zeigte sich ein ähnliches Bild, wenn auch nicht so stark ausgeprägt.

Die Caspase-9-Aktivität der dünn ausgesäten Kontrollzellen ist höher als bei den dicht ausgesäten Kontrollzellen, aber übersteigt nicht die der mit CD95L behandelten, dicht ausgesäten Kontrollzellen. Im Vergleich hierzu verhält sich das mitochondriale Membranpotential (MMP) der durch PI ermittelten Apoptose entsprechend, d.h. Reduktion des MMP in den Ansätzen, die vermehrt Apoptose zeigen (s. Abschnitt 4.6).

Es ist denkbar, dass sich die ungewöhnlichen Ergebnisse der Caspase-8- und Caspase-9-Assays aus Differenzen in den benutzten Zellzahlen ergeben haben. Durch sorgfältige Zellzahl- und parallele Proteinbestimmung wurde jedoch versucht, diese mögliche Fehlerquelle auszuräumen.

Im Gegensatz zu Caspase-8 und -9 verhält sich die Aktivität der Effektorcaspase Caspase-3 als direkter Auslöser der Apoptose erwartungsgemäss, d.h. sie korreliert gut mit der Apoptoserate (siehe Abschnitt 4.8). Dadurch, dass hier die gleichen Zellpellets verwendet wurden, wie für die Caspase-8- und -9-Assays, erscheint ein Fehler bei der Proteinbeladung der Assays unwahrscheinlich. Eine einzelzell-bezogene Meßmethode, wie z.B. das „Cytometric Bead-Array“ von BectonDickinson (Oxford, GB) könnte die Ergebnisse sicherlich validieren.

Eine Wiederholung der Caspase-Assays für die mit konditioniertem Medium behandelten Zellkulturen ist ebenfalls notwendig, um zu zeigen, dass die molekulare Ursache für die Protektion dichter bzw. mit konditioniertem Medium behandelter Zellen gleich sind.

Es wäre auch sinnvoll, zusätzliche Western-Blot-Analysen zu den Caspasen und deren Spaltprodukten anzufertigen. Es könnten hiermit die absoluten Proteinmengen und auch das Ausmaß der proteolytischen Spaltung der Caspasen näher untersucht und mit den Ergebnissen der Caspase-Assays verglichen werden. Wären hier Differenzen zu sehen, z.B. solcher Art, dass zwar proteolytische Spaltung im WB sichtbar ist, diese aber nicht mit einer erhöhten Caspase-Aktivität einherginge, könnte dies auf eine post-proteolytische Hemmung der Caspase-Aktivität hindeuten wie von Stegh et al. für Bcl-x_L beschrieben [Stegh et al., 2002].

Die Ergebnisse der Caspase-Assays legen die Schlussfolgerungen nahe, dass eine gewisse Menge an aktivierter Caspase-8 auch in unbehandelten, nicht-apoptotischen (RKO-)Zellen vorhanden ist, die nicht unbedingt zu Apoptose führen muss und unter Umständen mit der Proliferation gekoppelt ist (siehe Abschnitt 1.3 und [Algeciras-Schimmich et al., 2002; Mendelsohn et al., 2002]). Ausserdem könnte die Apoptose-auslösende Wirkung der aktivierten Caspase-8 in den dünn ausgesäten, nicht behandelten Zellen durch bestimmte molekulare Mechanismen solcher Art gehemmt sein, dass die (relativ zu den dicht ausgesäten Kontroll-Zellen) erhöhte Caspase-8-Aktivität zwar noch nicht Apoptose auslöst, aber vielleicht bewirkt, dass eine bestimmte (hypothetische) Schwelle, nach der die apoptotische Kaskade in Gang gesetzt wird, schneller überschritten wird. Die Senkung dieser Schwelle würde bedeuten, dass ein geringerer pro-apoptotischer Stimulus schon Apoptose auslösen würde.

Die in den dünn ausgesäten, CD95L-inkubierten Zellkulturen gemessenen, hohen Caspase-8-Aktivitäten könnten allerdings auch Folge einer Rückkopplung des mitochondrialen Pathways über Caspase-9 sein [Slee et al., 1999] - dies würde allerdings die hohe Basisaktivität in den dünn ausgesäten Zellen nicht erklären. Es ist nicht auszuschliessen, dass beide Faktoren hier Einfluß nehmen.

Es könnte auch angenommen werden, dass die erhöhten Caspase-Aktivitäten ihre apoptotische Wirkung nicht entfallten können, da die sie durch einen aktiven „Survival-Pathway“ (z.B. der NF κ B-Signalweg) gehemmt werden.

Nach Inkubation mit CD95L könnte es zur Supprimierung dieses anti-apoptotischen Signalwegs kommen, und so Apoptose schon nach einem geringen apoptotischen Stimulus ermöglicht werden [Xu et al., 1998].

Dass Caspase-8-Aktivität ursächlich für die erhöhte Proliferation ist, erscheint unwahrscheinlich, da die mit CD95L inkubierten Kulturen (sowohl dicht als auch dünn ausgesät) keine relativ höheren Zellzahlen in S- und G₂M-Phase aufweisen als die Kontrollansätze (siehe Abschnitt 4.3.2), was zu erwarten wäre, wenn erhöhte Caspase-8-Aktivität alleine schon zum Eintritt in den Zellzyklus führen würde.

Umgekehrt jedoch erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass durch Proliferation die höhere Caspase-Aktivität bedingt wird, wie in einigen Veröffentlichungen dargelegt wird (siehe Abschnitt 1.3). So wurde von Salmena et al. mittels Knock-Out-Studien gezeigt, dass bei T-Zellen Caspase-8 essentiell zur Proliferation benötigt wird. Caspase-8 könnte also auch bei anderen Zellarten eine Voraussetzung für die Fähigkeit zu proliferieren sein [Salmena et al., 2003]. Dies wäre auch als eine Kopplung von Proliferation und Apoptose zu sehen, die vor Entartung schützen könnte.

Mögliche andere Funktionen der Caspasen, die nicht der Apoptose-Induktion dienen, sind natürlich ebenfalls nicht auszuschliessen [Algeciras-Schimnich et al., 2002].

5.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung:

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde das Vorhandensein eines autokrin sezernierten Überlebensfaktors in Zellkulturen der Colonkarzinom-Zelllinie RKO nachgewiesen. Der Zusammenhang zwischen der durch den Faktor verursachten Protektion und der in den Zellkulturen beobachtete Reduktion der Proliferation konnte nicht abschliessend aufgeklärt werden, doch sprechen die Ergebnisse für eine Kopplung der beiden Zellfunktionen, die als genetischer Schutzmechanismus gegen Entartung zu sehen ist.

Als Modell für das Verhalten von Krebszellen in einem Tumor sind die durchgeführten *in vitro*-Studien von grossem Wert. Weitere zukünftige Experimente könnten zum tieferen Verständnis der Mechanismen führen, die es Krebszellen erlauben, zu metastasieren und sich vor verschiedenen, konstitutiven apoptotischen Stimuli zu schützen. Im Weiteren könnten diese Erkenntnisse zur Isolation und Charakterisierung des sezernierten, anti-apoptotischen

und migrationsfördernden Zytokins führen, dessen Neutralisation therapeutischen Nutzen aufweisen könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Abreu-Martin, M. T., Palladino, A. A., Faris, M., Carramanzana, N. M., Nel, A. E., and Targan, S. R. (1999). Fas activates the JNK pathway in human colonic epithelial cells: lack of a direct role in apoptosis. *Am J Physiol* 276, G599-605.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Ahn, J. S., Jang, I. S., Rhim, J. H., Kim, K., Yeo, E. J., and Park, S. C. (2003). Gelsolin for senescence-associated resistance to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 493-495.
- Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., and Peter, M. E. (2002). Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14, 721-726.
- Antonsson, B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306, 347-361.
- Armitage, R. J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6, 407-413.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C., and Peter, M. E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.
- Baudino, T. A., and Cleveland, J. L. (2001). The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21, 691-702.
- Bazarov, A. V., Adachi, S., Li, S. F., Mateyak, M. K., Wei, S., and Sedivy, J. M. (2001). A modest reduction in c-myc expression has minimal effects on cell growth and apoptosis but dramatically reduces susceptibility to Ras and Raf transformation. *Cancer Res* 61, 1178-1186.
- Belka, C., and Budach, W. (2002). Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 78, 643-658.
- Bernecker, O. Y., Huq, F., Heist, E. K., Podesser, B. K., and Hajjar, R. J. (2003). Apoptosis in heart failure and the senescent heart. *Cardiovasc Toxicol* 3, 183-190.
- Berry, M. G., Gui, G. P., Wells, C. A., and Carpenter, R. (2004). Integrin expression and survival in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 30, 484-489.
- Berzins, S. P., Godfrey, D. I., Miller, J. F., and Boyd, R. L. (1999). A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9787-9791.

- Birnbaum, M. J., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68, 2521-2528.
- Bleesing, J. J. (2003). Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Curr Pharm Des* 9, 265-278.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
- Böcker, D., Heitz (1997). *Pathologie* (München, Urban & Schwarzenberg).
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- Brustugun, O. T., Fladmark, K. E., Doskeland, S. O., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1998). Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ* 5, 660-668.
- Bullani, R. R., Wehrli, P., Viard-Leveugle, I., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Saurat, J. H., Tschopp, J., and French, L. E. (2002). Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res* 12, 263-270.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11, S27-31.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84, 215-222.
- Carl W., A. a. E. A. (2002). *Signaling to the p53 Tumor Suppressor through Pathways Activated by Genotoxic and Non-genotoxic Stresses* (New York, Academic Press).
- Cayrol, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311-320.
- Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M. A., Latham, D. E., and Loeffler, J. S. (2002). The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 62, 4307-4315.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.

- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-2688.
- Chao, D. T., Linette, G. P., Boise, L. H., White, L. S., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 182, 821-828.
- Chen, H. C., Chu, R. Y., Hsu, P. N., Hsu, P. I., Lu, J. Y., Lai, K. H., Tseng, H. H., Chou, N. H., Huang, M. S., Tseng, C. J., and Hsiao, M. (2003). Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. *Cancer Lett* 201, 97-106.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
- Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Velicuona, M. A., and Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554-559.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.
- Collins, K., Jacks, T., and Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2776-2778.
- Conradt, B., and Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197, 40-45.
- Craxton, A., Otipoby, K. L., Jiang, A., and Clark, E. A. (1999). Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes. *Adv Immunol* 73, 79-152.
- Crook, N. E., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168-2174.
- Daksis, J. I., Lu, R. Y., Facchini, L. M., Marhin, W. W., and Penn, L. J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.

- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S. I., *et al.* (2004). A IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*.
- Drexler, H. C., and Pebler, S. (2003). Inducible p27(Kip1) expression inhibits proliferation of K562 cells and protects against apoptosis induction by proteasome inhibitors. *Cell Death Differ* 10, 290-301.
- Dryja, T. P., Friend, S., and Weinberg, R. A. (1986). Genetic sequences that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. *Symp Fundam Cancer Res* 39, 115-119.
- Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56, 351-358.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.
- Eichler, H. G., Hubbard, R., and Snell, K. (1981). The role of serine hydroxymethyltransferase in cell proliferation: DNA synthesis from serine following mitogenic stimulation of lymphocytes. *Biosci Rep* 1, 101-106.
- Ekert, P. G., Silke, J., Hawkins, C. J., Verhagen, A. M., and Vaux, D. L. (2001). DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* 152, 483-490.
- Ekshyyan, O., and Aw, T. Y. (2004). Apoptosis in acute and chronic neurological disorders. *Front Biosci* 9, 1567-1576.
- Ellison, V., and Stillman, B. (1998). Reconstitution of recombinant human replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem* 273, 5979-5987.
- Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.

- Feldmann, P. H. (2003). <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor/mitose.htm>.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.
- Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.
- Fornaro, M., Plescia, J., Chheang, S., Tallini, G., Zhu, Y. M., King, M., Altieri, D. C., and Languino, L. R. (2003). Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem* 278, 50402-50411.
- Fraser, A., McCarthy, N., and Evan, G. I. (1996). Biochemistry of cell death. *Curr Opin Neurobiol* 6, 71-80.
- Fredersdorf, S., Burns, J., Milne, A. M., Packham, G., Fallis, L., Gillett, C. E., Royds, J. A., Peston, D., Hall, P. A., Hanby, A. M., *et al.* (1997). High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6380-6385.
- Furukawa, Y., Nishimura, N., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., and Nakamura, M. (2002). Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 39760-39768.
- Gabrilovich, D., and Pisarev, V. (2003). Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets* 4, 525-536.
- Gaubatz, S., Lees, J. A., Lindeman, G. J., and Livingston, D. M. (2001). E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21, 1384-1392.
- Gaumer, S., Guenal, I., Brun, S., Theodore, L., and Mignotte, B. (2000). Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in Drosophila. *Cell Death Differ* 7, 804-814.
- Goke, R., Gregel, C., Goke, A., Arnold, R., Schmidt, H., and Lankat-Buttgereit, B. (2004). Programmed cell death protein 4 (PDCD4) acts as a tumor suppressor in neuroendocrine tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 220-221.
- Green, D. R., and Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30.
- Greider, C., Chattopadhyay, A., Parkhurst, C., and Yang, E. (2002). BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 21, 7765-7775.

- Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg, S. A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155, 1823-1841.
- Gu, Y., Sarnecki, C., Aldape, R. A., Livingston, D. J., and Su, M. S. (1995). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J Biol Chem* 270, 18715-18718.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-2952.
- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* 22, 15-20.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820-1828.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D., and Korsmeyer, S. J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3, 413-422.
- Harrington, E. A., Fanidi, A., and Evan, G. I. (1994). Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev* 4, 120-129.
- Harris, C. C., and Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-1327.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Heinrichs, S., and Deppert, W. (2003). Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals. *Oncogene* 22, 555-571.
- Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665-676.
- Herr, I., Ucur, E., Herzer, K., Okouoyo, S., Ridder, R., Krammer, P. H., von Knebel Doeberitz, M., and Debatin, K. M. (2003). Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res* 63, 3112-3120.

-
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-2681.
- Hirama, T., and Koeffler, H. P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-854.
- Holbrook N.J., M. G. R., Lockshin R.A. (1996). *Cellular Ageing and Cell Death* (New York, Wiley-Liss).
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-3555.
- Horvitz, H. R. (2003). Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci Rep* 23, 239-303.
- Horvitz, H. R., and Sulston, J. E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 96, 435-454.
- Hueber, A. O., and Evan, G. (1998). Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet.* 9, 364-367.
- Hunt, T. (1991). Cell biology. Cell cycle gets more cyclins. *Nature* 350, 462-463.
- Hussain, S. P., and Harris, C. C. (2000). Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 462, 311-322.
- Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. (2001). Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 562-567.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Iwai, K., Hirata, K., Ishida, T., Takeuchi, S., Hirase, T., Rikitake, Y., Kojima, Y., Inoue, N., Kawashima, S., and Yokoyama, M. (2004). An anti-proliferative gene BTG1 regulates angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 628-635.
- Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E. L., Penn, L. Z., Andrews, D., Knudson, C. M., and Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *Embo J* 22, 5459-5470.
- Jiang, H. Y., Wek, S. A., McGrath, B. C., Lu, D., Hai, T., Harding, H. P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D. R., and Wek, R. C. (2004). Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 24, 1365-1377.

- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349-352.
- Kasof, G. M., Goyal, L., and White, E. (1999). Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol* 19, 4390-4404.
- Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A. N., Li, Z., Cowan, K. H., and Seth, P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 57, 5441-5445.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-3985.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., and Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182, 1777-1783.
- Kerr, J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-474.
- Kerr, J. F., Harmon, B., and Searle, J. (1974). An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci* 14, 571-585.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., *et al.* (1997). Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6939-6942.
- Knudsen, E. S., and Wang, J. Y. (1996). Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* 271, 8313-8320.
- Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E., and Oltvai, Z. N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4, 327-332.
- Krammer, P. H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9, 1277-1287.

- Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S., and Krammer, P. H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58-69.
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259.
- Lamothe, B., and Aggarwal, B. B. (2002). Ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL inhibits apoptosis induced by TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) through suppression of caspases-8, 7, and 3 and BID cleavage in human acute myelogenous leukemia cell line HL-60. *J Interferon Cytokine Res* 22, 269-279.
- Lee, J. W., and Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 17, 188-202.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-649.
- Lees, J. A., Buchkovich, K. J., Marshak, D. R., Anderson, C. W., and Harlow, E. (1991). The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *Embo J* 10, 4279-4290.
- Leu, C. M., Wong, F. H., Chang, C., Huang, S. F., and Hu, C. P. (2003). Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene* 22, 7809-7818.
- Lewis, K. (2000). Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 503-514.
- Liu, J., Cui, Z. S., Luo, Y., Jiang, L., Man, X. H., and Zhang, X. (2004). Effect of cyclin G2 on proliferative ability of SGC-7901 cell. *World J Gastroenterol* 10, 1357-1360.
- Lloyd, R. V., Erickson, L. A., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, J. C., and Scheithauer, B. W. (1999). p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154, 313-323.
- Lloyd, R. V., Jin, L., Qian, X., and Kulig, E. (1997). Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 150, 401-407.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M., and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3, 231-234.
- Lutter, M., Perkins, G. A., and Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* 2, 22.
- Malorni, W. (2002). Morphological Aspects of Apoptosis (Rom, (<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/malorni/malorni.htm>)).

- Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H., and Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13, 882-886.
- Martin-Villalba, A., Hahne, M., Kleber, S., Vogel, J., Falk, W., Schenkel, J., and Krammer, P. H. (2001). Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8, 679-686.
- McCarthy, J. (2003). Programmed Cell Death: Chapter 2 Apoptosis and development.).
- Mena, M. A., Casarejos, M. J., and Garcia de Yebenes, J. (1999). The effect of glia-conditioned medium on dopamine neurons in culture. Modulation of apoptosis, tyrosine hydroxylase expression and 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity. *J Neural Transm* 106, 1105-1123.
- Mendelsohn, A. R., Hamer, J. D., Wang, Z. B., and Brent, R. (2002). Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6871-6876.
- Mendelsohn, J. (2001). The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8, 3-9.
- Metz, T., Harris, A. W., and Adams, J. M. (1995). Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell* 82, 29-36.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Mihara, K., Cao, X. R., Yen, A., Chandler, S., Driscoll, B., Murphree, A. L., T'Ang, A., and Fung, Y. K. (1989). Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 246, 1300-1303.
- Millband, D. N., Campbell, L., and Hardwick, K. G. (2002). The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol* 12, 205-209.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J. V., Wu, M., and Hunt, T. (1989). The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* 12, 77-97.
- Mitsiades, N., Yu, W. H., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 61, 577-581.

- Mittnacht, S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 21-27.
- Moreno, A., Villar, M. L., Camara, C., Luque, R., Cespon, C., Gonzalez-Porque, P., Roy, G., Lopez-Jimenez, J., Bootello, A., and Santiago, E. R. (2001). Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 97, 242-249.
- Muller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W., and Eilers, M. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* 15, 2561-2576.
- Nagahara, H., Ezhevsky, S. A., Vocero-Akbani, A. M., Kaldis, P., Solomon, M. J., and Dowdy, S. F. (1999). Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14961-14966.
- Nasmyth, K. (1996). Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274, 1643-1645.
- Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F., Bernardo, A., Burgio, V. L., Agresti, C., and Levrero, M. (1998). Nuclear factor κ B-independent cytoprotective pathways originating at tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* 273, 31262-31272.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., and Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.
- Newton, K., Harris, A. W., and Strasser, A. (2000). FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *Embo J* 19, 931-41.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., and Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J* 12, 3679-3684.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K., and Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 457-463.
- O'Connor, P. M., and Fan, S. (1996). DNA damage checkpoints: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res* 2, 165-173.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-2624.

- Olivier, M., Goldgar, D. E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., and Eeles, R. A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63, 6643-6650.
- Parikh, A. A., Fan, F., Liu, W. B., Ahmad, S. A., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bielenberg, D., Bucana, C. D., Klagsbrun, M., and Ellis, L. M. (2004). Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol* 164, 2139-2151.
- Parker, M. G. (1990). Structure and function of nuclear hormone receptors. *Semin Cancer Biol* 1, 81-87.
- Partovian, C., and Simons, M. (2004). Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* 16, 951-957.
- Pawson, T. (1993). Signal transduction--a conserved pathway from the membrane to the nucleus. *Dev Genet* 14, 333-338.
- Peter, M. E., and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.
- Pouliot, N., and Burgess, A. W. (2000). Multiple autocrine factors including an extracellular matrix protein are required for the proliferation and spreading of human colon carcinoma cells in vitro. *Growth Factors* 18, 31-49.
- Pouliot, N., Connolly, L. M., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Burgess, A. W. (2000). Colon cancer cells adhesion and spreading on autocrine laminin-10 is mediated by multiple integrin receptors and modulated by EGF receptor stimulation. *Exp Cell Res* 261, 360-371.
- Quinn, L., Coombe, M., Mills, K., Daish, T., Colussi, P., Kumar, S., and Richardson, H. (2003). Buffy, a Drosophila Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *Embo J* 22, 3568-3579.
- Ravitz, M. J., and Wenner, C. E. (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res* 71, 165-207.
- Reers, M., Smiley, S. T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., and Chen, L. B. (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 260, 406-417.
- Richards, C. A., Short, S. A., Thorgeirsson, S. S., and Huber, B. E. (1990). Characterization of a transforming N-ras gene in the human hepatoma cell line Hep G2: additional evidence

- for the importance of c-myc and ras cooperation in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 50, 1521-1527.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311-5317.
- Ruff-Jamison, S., McGlade, J., Pawson, T., Chen, K., and Cohen, S. (1993). Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHC in the mouse. *J Biol Chem* 268, 7610-7612.
- Sadowski-Debbing, K., Coy, J. F., Mier, W., Hug, H., and Los, M. (2002). Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50, 19-34.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P., Berry, D., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W., McGlade, J., Ohashi, P., Hakem, R. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-95.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., *et al.* (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-986.
- Savill, J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53, 491-508.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999a). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999b). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-22538.
- Schimmer, A. D., Hedley, D. W., Pham, N. A., Chow, S., and Minden, M. D. (2001). BAD induces apoptosis in cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL without loss of mitochondrial membrane potential. *Leuk Lymphoma* 42, 429-443.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R., and Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 435-478.

- Schories, B., Engel, K., Dorken, B., Gossen, M., and Bommert, K. (2004). Characterization of apoptosis-induced Mcm3 and Cdc6 cleavage reveals a proapoptotic effect for one Mcm3 fragment. *Cell Death Differ* 11, 940-942.
- Schreiber, V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., De Murcia, G., and De Murcia, J. M. (1995). A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4753-4757.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17, 829-874.
- Sheiness, D., and Bishop, J. M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 31, 514-521.
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (2001). Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 152, 237-250.
- Silke, J., and Vaux, D. L. (2001). Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci* 114, 1821-1827.
- Silver, D. L., Naora, H., Liu, J., Cheng, W., and Montell, D. J. (2004). Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* 64, 3550-3558.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Sneller, M. C., Straus, S. E., Jaffe, E. S., Jaffe, J. S., Fleisher, T. A., Stetler-Stevenson, M., and Strober, W. (1992). A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease. *J Clin Invest* 90, 334-341.
- St Croix, B., Florenes, V. A., Rak, J. W., Flanagan, M., Bhattacharya, N., Slingerland, J. M., and Kerbel, R. S. (1996). Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2, 1204-1210.
- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J. W., Florenes, V. A., Slingerland, J. M., and Kerbel, R. S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* 142, 557-571.

-
- Stegh, A. H., Barnhart, B. C., Volkland, J., Algeciras-Schimmich, A., Ke, N., Reed, J. C., and Peter, M. E. (2002). Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem* 277, 4351-4360.
- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* 412, 157-169.
- Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.
- Stupack, D. G., and Cheresch, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115, 3729-3738.
- Sugrue, M. M., Shin, D. Y., Lee, S. W., and Aaronson, S. A. (1997). Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9648-9653.
- Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
- Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1981). Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 82, 41-55.
- Supriatno, Harada, K., Hoque, M. O., Bando, T., Yoshida, H., and Sato, M. (2002). Overexpression of p27(Kip1) induces growth arrest and apoptosis in an oral cancer cell line. *Oral Oncol* 38, 730-736.
- Takeichi, M. (1994). The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Prog Clin Biol Res* 390, 145-153.
- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., and Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S61-70; discussion S70-62.
- Thomas, G. V., Szigeti, K., Murphy, M., Draetta, G., Pagano, M., and Loda, M. (1998). Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 153, 681-687.
- Thornberry, N. A. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53, 478-490.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., and et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

- Tokudome, T., Horio, T., Fukunaga, M., Okumura, H., Hino, J., Mori, K., Yoshihara, F., Suga, S., Kawano, Y., Kohno, M., and Kangawa, K. (2004). Ventricular nonmyocytes inhibit doxorubicin-induced myocyte apoptosis: involvement of endogenous endothelin-1 as a paracrine factor. *Endocrinology* 145, 2458-2466.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Tsai, L. H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E., and Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 8, 1593-1602.
- Vairo, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., DeCaprio, J. A., Ewen, M. E., Koff, A., and Adams, J. M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 20, 4745-4753.
- van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 487-497.
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Vaux, D. L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 499-504.
- Venkateswarlu, S., Dawson, D. M., St Clair, P., Gupta, A., Willson, J. K., and Brattain, M. G. (2002). Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21, 78-86.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773-779.
- Verhagen, A. M., Coulson, E. J., and Vaux, D. L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2, REVIEWS3009.
- Viard-Leveugle, I., Veyrenc, S., French, L. E., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2003). Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma. *J Pathol* 201, 268-277.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) (Solothurn, Jent & Gassmann).

- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., and Newmeyer, D. D. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.
- Wallach, D., Boldin, M., Goncharov, T., Goltsev, Y., Mett, I., Malinin, N., Adar, R., Kovalenko, A., and Varfolomeev, E. (1996). Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family. *Behring Inst Mitt*, 144-155.
- Walsh, C.M., Wen, B.G., Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Dixit, V.M., Hedrick, S.M., (1998). A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity*, 8, 439-49.
- Wang, Q., Wang, X., and Evers, B. M. (2003). Induction of cIAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B. *J Biol Chem* 278, 51091-51099.
- Watanabe, H., Abe, H., Takeuchi, S., and Tanaka, R. (2000). Protective effect of microglial conditioning medium on neuronal damage induced by glutamate. *Neurosci Lett* 289, 53-56.
- Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15, 509-514.
- Wittenberg, C., Sugimoto, K., and Reed, S. I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* 62, 225-237.
- Wolf, B. B., and Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
- Wu, C., and Dedhar, S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* 155, 505-510.
- Wu, C. L., Classon, M., Dyson, N., and Harlow, E. (1996). Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. *Mol Cell Biol* 16, 3698-3706.
- Wu, Q., Kirschmeier, P., Hockenberry, T., Yang, T. Y., Brassard, D. L., Wang, L., McClanahan, T., Black, S., Rizzi, G., Musco, M. L., *et al.* (2002). Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 277, 36329-36337.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie, A. H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11, 95-103.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

- Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 10, 400-403.
- Xu, Y., Bialik, S., Jones, B. E., Iimuro, Y., Kitsis, R. N., Srinivasan, A., Brenner, D. A., and Czaja, M. J. (1998). NF-kappaB inactivation converts a hepatocyte cell line TNF-alpha response from proliferation to apoptosis. *Am J Physiol* 275, C1058-1066.
- Yanagisawa, K., Kosaka, A., Iwahana, H., Nakanishi, M., Tominaga, S. (1999). Opposite regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during contact inhibition. *J Biochem* 125, 36-40.
- Yang, Y. L., and Li, X. M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10, 169-177.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57, 443-478.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Yuan, J., Yan, R., Kramer, A., Eckerdt, F., Roller, M., Kaufmann, M., and Strebhardt, K. (2004). Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., and Levine, A. J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-993.
- Zornig, M., Hueber, A.O., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1-37.
- Zornig, M., Hueber, A. O., and Evan, G. (1998). p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr Biol* 8, 467-470.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

7 Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Dr. Martin Zörnig für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Vergabe des äußerst interessanten Themas und für seine sehr entgegenkommende, hilfsbereite Betreuung.

Bei Frau Dr. Ina Oehme möchte ich mich für die Einführung in die verschiedenen Methoden, die ständige Unterstützung und ihre stete Bereitschaft ihr reichhaltiges Wissen weiterzugeben, bedanken.

Dank gilt auch Susanne Bösler, Dr. Marie-Louise Brezniceanu, Dr. Kirsten Völp, Dr. Wiebke Baum, Dr. Vladimir Kirkin, Robert Pick und Sara Mateus-Fernandez für ein angenehmes Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe.

Meinen Eltern, meinem Bruder Martin, seiner Familie, meinen Freunden (v.a. René Zahedi für die grosse Hilfe bei der Promotion) und vor allem Henriette Sattler möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung danken.

8 Lebenslauf

Name: Tim Bläsner

Adresse: Kuhwaldstr. 60
60486 Frankfurt/Main

Geburtsdatum: 29.12.1977

Geburtsort: Böblingen

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Helmut Bläsner
Hella Bläsner, geb. Thier

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule Gerresheim, Düsseldorf
1988-1995 Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf
1995-1996 Auslandsaufenthalt: Box Hill School, Dorking/England
1996-1997 Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf

Zivildienst: 1997-1998 Unfallchirurgie des St.Gertrauden-KH, Berlin

Studium: ab 1.4.1999 Studium der Medizin an der Goethe-Universität
Frankfurt

2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 1. Staatsexamen
2002-2003 praktischer Teil der Promotion in der Arbeitsgruppe
Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt
2005 2. Staatsexamen

9 Anhang

9.1 Cytokine-Array

- ENA78
- GRO
- GRO- α
- I-309
- IL-1 α
- IL-1 β
- IL-2 bis IL-8
- IL-10
- IL-12
- IL-13
- IL-15
- IFN- γ
- MCP1
- MCP2
- MCP3
- MCSF
- MDC
- MIG
- MIP1 δ
- RANTES
- SCF
- SDF-1
- TARC
- TGF- β 1
- TNF- α
- TNF- β
- EGF
- IGF-1
- Ang
- OSM
- Tpo
- VEGF
- PDGF B
- Leptin
- BDNF
- BLC
- CK β 8-1
- Eotaxin
- Eotax2
- Eotax3
- FGF-4
- FGF-6
- FGF-7
- FGF-9

- Fit-3L
- Fracta.
- Gcp2
- GDNF
- HGF
- IGFBP1
- IGFBP2
- IGFBP3
- IGFBP4
- IL-16
- IP10
- LIF
- LIGHT
- MCP4
- MIF
- MIP3 α
- NAP2
- NT-3
- NT-4
- Osteop
- PARC
- PIGF
- TGF β 2
- TGF β 3
- TIMP1
- TIMP2

9.2 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Abhängigkeit der CD95L-induzierten Apoptose von Proliferationsverhalten und Zelldichte bei der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO“ im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus unter Betreuung und Anleitung von Prof. Winfried Wels mit Unterstützung durch Dr. Martin Zörnig ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Effekt der Zelldichte auf Proliferation und Apoptose bei der RKO-Rektumkarzinomzelllinie untersucht werden.

Neben Invasion, Entdifferenzierung und Metastasierung kann bei Krebserkrankungen auch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit zu den Charakteristika der Malignität gezählt werden. Bei Leukämien, Lymphomen und bestimmten soliden Tumoren, bei denen eine chirurgische Resektion nur eingeschränkt möglich ist, bedeutet jedoch ein langsames Wachstum, d.h. eine geringe Proliferation der Tumorzellen, in der Regel keine verbesserte Prognose, da sie mit schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung einhergeht.

Die molekularen Ursachen dieser Behandlungsresistenz sind bisher nicht vollständig geklärt und wahrscheinlich nicht bei allen Krebserkrankungen auf identischen Mechanismen beruhend.

Vorstellbar ist, dass sich das Gesamtsystem der Zelle während des Teilungsprozesses sensibler gegenüber Schädigungen der DNA, wie sie durch Bestrahlung und die meisten Chemotherapeutika ausgelöst werden, präsentiert. Dies kann durch unterschiedlichste molekulare Mechanismen verursacht sein.

Um den möglichen Einfluss des Proliferationsverhaltens einer Zellpopulation auf das Apoptose-Verhalten zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Proliferationsgeschwindigkeit einer Zellkultur mittels Dichte-Arretierung zu senken. Hierzu wurden RKO-Zellen in konfluenter und subkonfluenter Dichte kultiviert. Ebenfalls wurden Unterschiede bei der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt. Durch Inkubation mit CD95L konnte dann ein Zusammenhang von Proliferation und Apoptosesensitivität ermittelt werden, d.h. die „Zellzyklusabhängigkeit“ der CD95L-induzierte Apoptose untersucht werden. Hierbei zeigten sich Zellen mit geringerer Proliferationsrate resistenter gegenüber CD95L. Verschiedene Methoden (z.B. Western-Blot-Analyse, FACS-Messungen) wurden zur Aufklärung der molekularen Ursachen genutzt.

Die Arbeit zeigte auch das Vorhandensein eines molekular nicht identifizierten, autokrin in das Medium sezernierten Faktors, der zu verstärkter Resistenz gegenüber CD95L führte. Dieser Faktor erhöhte auch die Migration und Invasivität der RKO-Zellen und verstärkte damit die malignen Eigenschaften der Tumorzellen. Die zukünftige molekulare Identifikation dieses Faktors könnte therapeutisch bedeutsam sein.

Summary

The aim of this thesis was to study the effect of cell density on proliferation and apoptosis in the RKO colon carcinoma cell line.

Apart from invasion, dedifferentiation and metastasis, the growth rate is considered as a characteristic of malignancy. In leukaemias, lymphomas and certain solid tumors (where surgical removal is not possible), a low proliferation rate does not correlate with a better prognosis, because slowly growing tumors often respond worse to treatment with chemotherapeutics and radiation. The molecular causes of this resistance to treatment are not completely understood and are connected with decreased apoptosis sensitivity.

It is possible that the cell is more sensitive to damages caused by chemotherapeutics and radiation during cell division. This may be due to various molecular mechanisms.

During this project we used density-induced growth arrest to analyse the possible molecular connection between proliferation and apoptosis behaviour. RKO cells were cultivated in confluent and sub-confluent conditions and their distribution within the different cell cycle phases correlated with their sensitivity towards CD95L.

Slowly proliferating, dense grown cell cultures were more resistant to CD95L induced apoptosis.

We collected evidence for the existence of a survival factor secreted by RKO cells whose amount in the supernatant apparently was higher in dense cell cultures than in sparse cultures. This factor also increased migration and invasiveness of RKO cells, and although we could not solve the molecular nature of the factor, its future identification may have therapeutic potential.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Abhängigkeit der CD95L-induzierten Apoptose von Proliferationsverhalten und Zelldichte bei der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO“ im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus unter Betreuung und Anleitung von Prof. Winfried Wels mit Unterstützung durch Dr. Martin Zörnig ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, 15.1.2006

Tim Bläsner

Lebenslauf

Name: Tim Bläsner

Adresse: Kuhwaldstr. 60
60486 Frankfurt/Main

Geburtsdatum: 29.12.1977

Geburtsort: Böblingen

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Helmut Bläsner
Hella Bläsner, geb. Thier

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule Gerresheim, Düsseldorf
1988-1995 Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf
1995-1996 Auslandsaufenthalt: Box Hill School, Dorking/England
1996-1997 Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf

Zivildienst: 1997-1998 Unfallchirurgie des St.Gertrauden-KH, Berlin

Studium: ab 1.4.1999 Studium der Medizin an der Goethe-Universität
Frankfurt

2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 1. Staatsexamen
2002-2003 praktischer Teil der Promotion in der Arbeitsgruppe
Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt
2005 2. Staatsexamen

Frankfurt am Main, 15.1.2006

Tim Bläsner